

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Eliška Petříková

Efektivita a mechanismy postzygotické reprodukční izolace diploidů a polyploidů u rostlin
*The strength and mechanisms of postzygotic breeding barriers between diploids and polyploids in
plants*

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Martin Čertner, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Martinu Čertnerovi, Ph.D., za to, že mě vedl při vypracování této práce, a za jeho cenné připomínky a pomoc. Dále děkuji mnohým kolegům z oddělení cévnatých rostlin Katedry botaniky PřF UK za rady, které mi poskytli. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za nekončící podporu a neskonalou trpělivost.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 8. 2018

Podpis:

Abstrakt

Cílem této literární rešerše bude zaměřit se na celogenomovou duplikaci jako na mechanismus sympatrické speciace v rostlinných populacích, popsat princip reprodukční izolace nově vzniklých polyploidů od jejich diploidních předků a diskutovat efektivitu reprodukční izolace mezi různými rostlinnými druhy. V práci bude představen mechanismus tzv. triploidního bloku, tj. postzygotické reprodukční izolace působící při kříženích diploidů s tetraploidy. Triploidní blok se projevuje převážně dvěma způsoby, a to omezením vitality triploidních hybridů, tedy neschopnosti diploidů a tetraploidů vytvořit životaschopná semena, nebo omezením jejich fertility v pododě tvorby neživotaschopných či aneuploidních gamet. V této práci bude též diskutována rozdílná účinnost triploidního bloku mezi různými rostlinnými druhy. Omezení reprodukční izolace nezřídka vede ke genovému toku mezi cytotypy, jehož mechanismy i intenzita v přirozených populacích druhů s ploidní variabilitou budou rovněž v práci představeny. Poslední kapitola práce bude věnována shrnutí dosavadních poznatků o cytotypové variabilitě v populacích *Butomus umbellatus*, modelového druhu pro navazující magisterskou práci.

Klíčová slova: duplikace genomu, sympatrická speciace, postzygotická reprodukční izolace, genový tok mezi cytotypy, *Butomus umbellatus*

Abstract

The aim of this literature survey is to focus on whole genome duplication as a mechanism of sympatric speciation in plant populations, to explain the principals of reproductive isolation between neopolyploids and their diploid ancestors and to discuss the efficiency of reproductive isolation among various plant species. The mechanism of so-called triploid block will be introduced in this thesis. Triploids block is a form of postzygotic reproductive isolation which is realized during interploidy crosses. The two main mechanisms of triploid block are the hybrid inviability, means production of inviable hybrid seed, and reduced fertility of triploid hybrids by production of aneuploid or inviable gametes. The efficiency of triploid block varies between plant species and these differences will be also discussed. The reduction in reproductive isolation often leads to gene flow between cytotypes. Mechanisms and intensity of gene flow between cytotypes of various species will be also introduced. In the end, this thesis will be enriched with a summary of existing knowledge about cytotype variability in populations of *Butomus umbellatus*, the model species for following master's thesis.

Key words: whole genome duplication, sympatric speciation, postzygotic reproductive isolation, gene flow between cytotypes, *Butomus umbellatus*

Obsah

1	Úvod	1
2	Polyploidizace	2
2.1	Cesty vedoucí ke vzniku polyploidů	3
2.1.1	Somatické mutace	3
2.1.2	Neredukované gamety	4
2.2	Výhody a nevýhody být polyploidem	6
2.2.1	Princip vyloučení minoritního cytotypu	7
3	Postzygotická reprodukční bariéra mezi diploidy a polyploidy	9
3.1	Mechanismy triploidního bloku	11
3.1.1	Kolaps vývoje triploidních semen	11
3.1.2	Omezení životaschopnosti a vitality triploidních hybridů	15
3.1.3	Omezení fertility triploidních hybridů	16
4	Prolomení reprodukční izolace	17
4.1	Mechanismy genového toku	18
4.2	Empirická data o genovém toku mezi různými cytotypy z přírody	19
5	Modelový druh <i>Butomus umbellatus</i> L.	20
5.1	Biologické vlastnosti a ekologie modelového druhu	20
5.2	Cytotypová variabilita	21
6	Závěr	23
7	Použitá literatura	24

1 Úvod

Polyploidie, vlastnictví více než dvou kompletních chromozomových sad, je na rozdíl od živočichů u rostlin velmi běžnou záležitostí (Levin 2002; Mable 2004b). Téměř všechny krytosemenné rostliny i kaprad'orosty podle současných odhadů prošly ve své evoluci alespoň jednou polyploidizační událostí (Soltis and Soltis 1999; Wendel *et al.* 2016).

Polyploidizace vede u rostlin k vytvoření okamžité postzygotické reprodukční izolace a je považována za jeden z nejvýznamnějších způsobů sympatrické speciace (Otto and Whitton 2000). Jelikož nejvíce studovanými systémy jsou ty, ve kterých se vyskytuje diploidní a tetraploidní cytotyp, nazýváme tuto reprodukční bariéru triploidním blokem (Marks 1966). Mechanismy triploidního bloku jsme pro účely této bakalářské práce rozdělili na omezení vitality triploidních hybridů a omezení jejich fertility. Omezení vitality triploidů spočívá v neschopnosti diploidů a tetraploidů vytvořit životaschopné potomstvo. Nejčastější příčinou aborce semen je kolaps endospermu způsobený vychýlením z poměru dvou maternálních ku jednomu paternálnímu genomu v buňkách endospermu a následné disbalanci v genomovém imprintingu (Haig and Westoby 1991; Scott *et al.* 1998). Snížená fertilita triploidních hybridů je způsobená především chybami v procesu samčí i samičí gametogeneze (Comai 2005).

Efektivita triploidního bloku je však velmi variabilní a u mnoha rostlinných druhů dochází k hybridizaci mezi cytotypy a následnému genovému toku mezi nimi (Petit *et al.* 1999). Především sekundární kontaktní zóny cytotypů jsou místem studia genového toku mezi cytotypy a stejně tak jako je variabilní úroveň reprodukční izolace různých cytotypů, liší se i intenzita a mechanismy genového toku mezi nimi (Kolář *et al.* 2017). Genový tok mezi cytotypy může mít výrazný vliv na adaptivní vlastnosti cytotypů (Menken *et al.* 1995), může způsobit diferenciaci jejich ekologických nik (Hülber *et al.* 2015), ale především zapříčiňuje zvýšení genetické diverzity v populacích diploidů i polyploidů (Han *et al.* 2015). Velmi zajímavými pro studium této problematiky jsou i cytotypově smíšené populace šmelu okoličnatého (*Butomus umbellatus* L.), u kterého byl prozatím objeven jen diploidní a triploidní cytotyp, které jsou ale schopné se do jisté míry křížit (Krahulcová and Jarolímová 1993).

Cílem této bakalářské práce tedy bude se zaměřit na polyploidizaci jako na možný způsob sympatrické speciace v rostlinných populacích a popsat její roli ve vytvoření okamžité postzygotické reprodukční bariéry mezi diploidy a polyploidy různých rostlinných druhů. Práce se dále zaměří na problematiku triploidního bloku, na jeho rozdílnou efektivitu, a též na možnost jeho překonání, které vede k hybridizaci mezi cytotypy a následnému genovému toku. V práci budou dále rozebrány variabilní mechanismy a intenzita genového toku u různých rostlinných druhů. Poslední kapitola shrne dosavadní informace o cytotypové variabilitě u druhu *Butomus umbellatus*, modelové rostliny pro navazující magisterskou práci.

2 Polyploidizace

Polyploidie, tedy vlastnictví tří a více kompletních chromozómových sad v jádrech somatických buněk, byla objevena na počátku 20. století a již od začátku byla tomuto jevu věnována značná pozornost a to jak ze strany genetiků, cytologů, evolučních biologů, tak i ekologů (Müntzing, 1936; Ramsey and Ramsey, 2014; Wood *et al.*, 2009). Avšak již Hugo de Vries na konci 19. století rozeznával podle morfologických znaků nové formy pupalek (*Oenothera* spp.) a nazýval je mutacemi. Mezi ně patřila i mutanta *Oenothera gigas*, odvozená z rodičovského druhu *Oenothera lamarckiana*, u které byla v pozdějších studiích prokázána polyploidie (Lutz 1907; Gates 1913).

Proces duplikace genomu (polyploidizace), který vede ke vzniku polyploidů, sehrál významnou roli v evoluci rostlin, a to především krytosemenných a kaprad'orostů (Levin 2002; Jiao *et al.* 2011; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2013). V minulosti existovaly různé pohledy na to, jaké procento krytosemenných rostlin tvoří polyploidi. Stebbins (1938) předpokládal pro krytosemenné rostliny jen 20 až 40 % polyploidů, Masterson (1994) předpokládal přibližně 70 %. Moderní metody sekvenace rostlinných genomů však naznačují, že všechny krytosemenné rostliny prošly během své evoluční historie alespoň jednou epizodou duplikace genomu (Wendel *et al.* 2016). Pro kaprad'orosty jsou k dispozici pouze odhady na základě počtu chromozómů, které naznačují, že až 95 % všech druhů prošlo alespoň jednou duplikací genomu (Soltis and Soltis, 1999). Polyploidizace zároveň zřejmě spustila evoluční diverzifikaci některých rostlinných skupin včetně velikých čeledí, jako jsou Fabaceae, Solanaceae, Brassicaceae nebo Poaceae (Soltis *et al.*, 2009). V současné době víme, že polyploidizace je jeden z nejvýznamnějších způsobů sympatrické speciace u rostlin a je pravděpodobně příčinou 15 % speciálních událostí u krytosemenných rostlin a 31 % u kaprad'orostů (Wood *et al.* 2009). Taxonomický pohled na toto téma a především na rozlišování různých cytotypů jako separátních taxonů je však problematický (de Wet 1971).

Polyploidy můžeme rozdělit do tří základních kategorií: autopolyploidi, allopolyploidi a segmentální polyploidi (Ramsey and Schemske, 1998). Za autopolyploidy považujeme rostliny, které vznikly v jedné nebo více populacích v rámci jednoho druhu. Je pro ně typické, že všechny chromozómové sady jsou stejné nebo velmi podobné, mají tetrasomickou dědičnost a v průběhu meiózy zpravidla tvoří multivalenty (Levin 2002). Allopolyploidi jsou rostliny, které vznikly hybridizací mezi dvěma nebo více různými druhy, vyznačujícími se značnou odlišností genomů. Z tohoto důvodu nedochází k rekombinacím mezi rodičovskými subgenomy, allopolyploidi disponují disomickou dědičností a během meiózy tvoří bivalenty (Ramsey and Schemske 1998). Poslední skupinou jsou segmentální polyploidi, kteří jsou svými vlastnostmi řazeni někde mezi typické auto- a allopolyploidy. Jejich genomy jsou jen částečně diferencované, což umožňuje rekombinaci mezi homeologními úseky chromozómů. Během meiotického dělení mohou některé chromozómy tvořit bivalenty a jiné multivalenty (Levin 2002).

2.1 Cesty vedoucí ke vzniku polyploidů

Polyploidie vznikají jak v rámci jednoho druhu, tak mezidruhovou hybridizací. Ať už se jedná o auto- nebo allopolyploidy, v jejich evoluci jsou kritické dvě fáze, a to jejich samotný vznik a následné uchycení v populacích rodičovského diploidního cytotypu (Ramsey and Schemske 1998).

Thompson a Lumaret (1992) zmiňují kromě těchto dvou fází ještě třetí, vyžadující značnou odolnost a konkurenceschopnost polyploidů, a tou je jejich úspěšná expanze mimo rodičovské populace.

Jednou z možností vedoucí ke vzniku nových polyploidů (tzv. neopolyploidů) je splynutí dvou gamet se stejným počtem chromozomových sad jako mají somatické buňky, tedy neredukovaných neboli $2n$ gamet. Tento způsob umožňuje vznik tetraploida v jednom kroku. Alternativou je vznik neotetraploida ve dvou krocích, přes tzv. triploidní most (Ramsey and Schemske 1998). Nejprve dojde ke splynutí jedné neredukované gamety s gametou redukovanou za vzniku triploida, ten následně díky zvýšené produkci neredukovaných gamet může dát (patrně s větší pravděpodobností) vzniknout tetraploidu (Levin 2002). Přestože je diskutabilní, která z těchto dvou cest vzniku polyploidů je častější a úspěšnější, setkání dvou neredukovaných gamet diploidních rodičů je ze statistického hlediska málo pravděpodobné. Vznik tetraploidů a cytotypů vyšší ploidní úrovně pomocí triploidního mostu hraje nejspíše významnou roli v evoluci polyploidů, avšak u některých druhů mohou mít triploidní hybridy omezenou životaschopnost nebo sníženou fertilitu (např. v důsledku nepravidelného rozchodu chromozomů během triploidní meiózy), což pravděpodobně omezuje či úplně vylučuje uplatnění tohoto procesu u některých skupin rostlin (Ramsey and Schemske 1998; Yamauchi *et al.* 2004; Hanzl *et al.* 2014). Tato problematika bude podrobněji probrána v kapitolách 3 a 4.

Další možností vzniku polyploidů jsou somatické mutace, probíhající již od stádia zygoty nejen v meristémech, ale i v jiných somatických pletivech rostlin. Pokud dojde k somatickému zdvojení chromozomových sad ještě během juvenilních stádií života rostliny, jsou takoví jedinci k nerozeznání od polyploidů vzniklých fúzí neredukovaných gamet (Bretagnolle and Thompson 1995; Ramsey and Schemske 1998). K somatickým mutacím způsobujícím polyploidizaci může sice docházet i v pozdějších stádiích vývoje rostlin, ale jedná se pak spíše o vznik mixoploidních chimér (Ramsey and Schemske 1998).

2.1.1 Somatické mutace

Polyploidie vznikají do jisté míry i díky mutacím v jejich somatických pletivech nebo meristémech (Levin 2002). Od roku 1917, kdy Winge vyslovil hypotézu vzniku polyploidů skrze somatické mutace v zygotě nebo meristémech, až do sedmdesátých let minulého století byl tento způsob vzniku polyploidů považován za převládající (Bretagnolle and Thompson 1995). Pokud dojde ke zdvojení chromozomových sad již ve stádiu zygoty nebo raného embrya, vzniká zcela polyploidní prýt, který může dát vzniknout polyploidním potomkům, pokud je fertilní.

Jeden z prvních popsanych allotetraploidů byla prvosenska *Primula kewensis*, která vznikla z fertilních tetraploidních prýtů po somatické mutaci u jinak sterilního diploidního hybridu mezi druhy

Primula floribunda a *Primula verticillata* (Briggs and Walters 2001). Somatická duplikace byla prokázána i u F1 hybridů mezi druhy *Mimulus nelsoni* a *Mimulus lewisii*, kteří jsou diploidní, ale příležitostně produkují tetraploidní prýty. K somatickému zdvojení chromozómových sad dochází také u rostlin, které jsou poraněné a nebo jim byl odstraněn apikální meristém, jako tomu je například u rajčat (Jorgensen 1928).

K somatickým mutacím vedoucím ke vzniku polyploidů dochází i mimo meristematická pletiva. Velmi běžnou záležitostí jsou endopolyploidní buňky, např. tetra- či oktoploidní, které se mohou vyskytovat např. v kůře nebo některých pletivech středního válce stonku, jako bylo zjištěno u rodu *Vicia*. I tyto buňky mohou proliferovat, například při poranění rostliny nebo po napadení patogenem (v tomto případě autoři studie indukovali tvorbu nádoru bakteriemi rodu *Agrobacterium*) a dát tak vzniknout novému polyploidnímu prýtu (Coleman 1950).

Somatickou duplikaci chromozómů je možné ve stádiu zygoty i u mladých embryí indukovat například vysokou teplotou (angl. heat shock experiment). Randolph (1932) ve své studii vystavoval rostliny kukuřice teplotě mezi 40 až 48 °C na krátkou dobu ve čtyřhodinových intervalech, celý experiment trval 48 hodin. Mezi semenáčky se následně objevila necelá 2 % tetraploidů a téměř 1 % oktoploidů. Jednalo se však o značně drastický zásah. U některých semen nebyly zaznamenány žádné změny, u jiných docházelo např. k chromozómovým translokacím, úplné ztrátě některých chromozómů, k poškození endospermu a embrya nebo ke sterilizaci samičích i samčích gamet, nejspíše v důsledku vystavení teplotě vyšší než 48 °C. K dispozici je pouze omezené množství dalších informací o somatické duplikaci sad chromozómů u rostlin a o tom, do jaké míry je zodpovědná za vznik polyploidů v přirozených populacích.

2.1.2 Neredukované gamety

Přestože polyploidi mohou vznikat i somatickými mutacemi, neredukované ($2n$) gamety jsou pravděpodobně převládajícím mechanismem jejich vzniku (Ramsey and Schemske 1998; Kreiner *et al.* 2017b). Harlan a DeWet se v roce 1975 k tomuto tématu vyslovili mezi prvními. Jejich review, ve kterém shrnuli poznatky o 85 rostlinných rodech a několika stovkách druhů, potvrdilo, že polyploidi vznikají především díky neredukovaným gametám. Další mechanismy vzniku polyploidů sice byly rovněž zaznamenány, ale autoři je označili za evolučně zanedbatelné. Nejčastěji se napříč druhy vyskytovalo splnutí jedné neredukované gamety s gametou redukovanou ($2n + n$), a to jak při autotak allopolyploidizačních událostech. Takto vzniklí triploidní hybridy tvořili při zpětném křížení s rodičovskými rostlinami tetraploidní jedince, a při samoopylení dokonce hexaploidy. Dalším ze závěrů této přelomové studie bylo například, že nejúspěšnější cestou k životaschopným a fertilním polyploidům není autopolyploidizace v rámci jedné populace ani hybridizace mezi geneticky vzdálenými druhy, ale křížení mezi ekotypy a cytotypy jednoho druhu nebo druhů blízce příbuzných. Autoři též nastínili možnost, že autopolyploidizace může pomoci k překonání mezidruhově reprodukční bariéry, a že mezi autopolyploidy, k jejichž vzniku došlo pomocí neredukovaných gamet,

může docházet k hybridizaci a tvorbě allopolyploidů, kteří by křížením reprodukčně izolovaných diploidů v přírodě nevznikli.

Neredukované gamety vznikají kvůli chybám během meiózy, procesu buněčného dělení, který je nezbytný pro sexuální rozmnožování (Bretagnolle and Thompson 1995; Brownfield and Kohler 2011). Meióza je rozdělená na dvě hlavní části: meiózu I (tzv. heterotypické či redukční dělení), při kterém dochází k redukci sad chromozomů v dceřiných buňkách, a meiózu II, (tzv. homotypické, mitóze podobné dělení), při kterém se do gamet rozcházejí sesterské chromatidy chromozómů. Neredukované gamety mohou vznikat chybami v prvním i druhém meiotickém dělení (Bretagnolle and Thompson 1995). K tomuto procesu, nazývaném někdy meiotická restituce (angl. meiotic nuclear restitution) dochází jak během mikrosporogeneze tak megasporogeneze. Neredukovaná pylová zrna lze poznat podle velikosti, jejich průměr bývá o 10 až 40 % větší než u haploidních gamet (Jones 1990; Ramsey and Schemske 1998). V některých případech lze takto odlišit i gamety samičí, jejich přítomnost se ale většinou testuje pomocí kontrolovaných opylovacích experimentů nebo průtokové cytometrie (Bretagnolle and Thompson 1995; Kreiner *et al.* 2017b).

Jak u planých rostlin z přirozených populací, tak u ekonomicky významných rostlinných plodin byla pozorována produkce neredukovaných samčích i samičích gamet (Ramsey and Schemske 1998). Produkce těchto neredukovaných gamet se výrazně liší mezi jednotlivými druhy, ale může se lišit i mezi různými jedinci stejného druhu, z nichž někteří mohou disponovat schopností tvořit neredukované gamety a jiní nikoliv (Bretagnolle and Thompson 1995). Kreiner *et al.* (2017b) publikovali doposud nejdetailnější studii zabývající se mírou produkce samčích neredukovaných gamet v přirozených rostlinných populacích. Pomocí průtokové cytometrie analyzovali 1696 jedinců 24 druhů z čeledi Brassicaceae. Téměř 96 % všech studovaných jedinců mělo detekovatelné množství neredukovaných gamet. Přestože naprostá většina jedinců (75,1 %) produkovala jen velmi nízké množství neredukovaného pylu, mezi 0,1 % a 2 %, u menší skupiny jedinců (6,7 %) přesahovala produkce neredukovaných samčích gamet 5 %. Celková variabilita míry produkce neredukovaných gamet napříč všemi rostlinami byla obrovská, pohybovala se od 0 % do 85,6 %. Zde i v pracích různých dalších autorů se navíc opakovaně objevuje jeden nápadný trend. V přirozených rostlinných populacích převládají jedinci, kteří produkují jen zanedbatelné množství nebo dokonce žádné neredukované gamety, je zde však ale i malé procento jedinců, kteří produkují veliké množství $2n$ gamet. Tento trend byl zaznamenán u řebříčku *Achillea borealis* (Ramsey 2007), srhy říznačky (*Dactylis glomerata*; Maceira *et al.*, 1992), tomky alpské (*Anthoxanthum alpinum*; Bretagnolle, 2001) a nebo u druhu *Turnera sidoides* (Kovalsky and Solís Neffa 2012).

Produkcí neredukovaných gamet do jisté míry ovlivňují i faktory životního prostředí, a to zejména výrazné střídání teplot (Mason *et al.* 2011). Vliv však mohou mít i jiné stresové faktory, jako je nedostatek živin, osmotický stres, herbivorie nebo napadení patogenem (Ramsey and Schemske 1998). Frekvence vzniku nových polyploidů je tedy ovlivněna i změnami životního prostředí, což by mohlo naznačovat, že polyploidizace je jednou ze strategií rostlin umožňující překonat stresové

faktory a zajistit tak vyšší pravděpodobnost přežití (Kreiner *et al.* 2017b). Tuto hypotézu podporuje i studie, která se zabývala mnoha různými polyploidizačními událostmi, které bylo možné datovat do období masového vymírání na konci druhohor (tzv. K/T rozhraní, před 65 milionů lety). Protože toto období je spojené s výraznými změnami klimatu, především kvůli zvýšené vulkanické aktivitě, nově vzniklé polyploidní linie mohly mít díky rozdílům v genové expresi, vyšší adaptabilitě a odolnosti vyšší šanci na přežití než jejich diploidní předci (Fawcett *et al.* 2009).

Ramsey and Schemske (1998) na základě velkého množství dat z literatury vytvořili matematický model, na jehož základě odhadli, že druhy, které nejsou hybridního původu budou tvořit neredukované gamety s průměrnou frekvencí 0,56 %. Je ale zajímavé, že hodnoty zjištěné pomocí průtokové cytometrie u čeledi Brassicaceae byly podstatně vyšší – druhy průměrně produkovaly 2,5 % neredukovaných gamet (Kreiner *et al.* 2017a). Jednou z možných příčin je, že průtoková cytometrie umožňuje přesnější odhady těchto hodnot, ale nebyla běžně dostupnou technologií v době, ze které pochází většina studií citovaných v Ramsey and Schemske (1998). Nelze však vyloučit, že vyšší míra produkce $2n$ gamet ve studii Kreiner *et al.*, 2017b byla ovlivněna začleněním druhů, u kterých je produkce neredukovaného pylu atypicky častá (např. *Cardamine concatenata* s průměrem přibližně 10 %). Při průměrné produkci neredukovaných gamet 2,5 % by odhadovaná frekvence vzniku polyploidů byla $2,94 \times 10^{-4}$ za generaci. Tento odhad nicméně platí pouze pro některé druhy čeledi Brassicaceae (Kreiner *et al.* 2017a). Odhady, které vyslovili Ramsey a Schemske (1998) se pohybovaly v podobných hodnotách jako frekvence genových mutací, tedy o jeden řád níže (10^{-5}). Nicméně u druhů hybridogenního původu, které produkují několikanásobně větší množství neredukovaných gamet (průměr = 27,5 %) by se frekvence vzniku polyploidů měla pohybovat o dva řády výše (10^{-3}). Je tedy jen na budoucích studiích tyto hodnoty potvrdit nebo vyvrátit studiem přirozených populací u širšího spektra různých druhů a napříč různými čeleděmi.

2.2 Výhody a nevýhody být polyploidem

Stejně jako řada jiných evolučních procesů, i polyploidizace má své výhody a nevýhody. Polyploidie mohou být na jedné straně ekologicky adaptabilnější, snáze schopni přežít nepříznivé podmínky než jejich diploidní rodiče, na straně druhé může být polyploidie slepou vývojovou uličkou (Comai 2005). První dvě jasné výhody polyploidů jsou přímými důsledky celogenomové duplikace, je to heterozní efekt a přítomnost nadbytečných kopií genů v genomu (Parisod *et al.* 2010). Heterozní efekt se projevuje především u allopolyploidů, ale i u autopolyploidů v F1 generaci. Díky vyšší genové heterozygotitě mohou být polyploidie větší, více odolné a produkovat větší semena a plody než jejich diploidní předchůdci. To však není způsobeno jenom heterozí, ale i samotným vyšším obsahem DNA v jádrech, který vede i ke zvětšení buněk a rostlinných orgánů (Masterson 1994; Miller *et al.* 2012). Genová redundance (tj. přítomnost nadbytečných kopií genů) je další jasnou výhodou. Díky zdvojení počtu kopií veškerých genů mohou polyploidie nahradit či kompenzovat alely, které by v případě výskytu v jedné kopii byly pro jejich potomky letální, a mohou dokonce s nadbytečnými kopiemi

v evoluci „experimentovat“ a získat tak pro ně nové funkce, např. nové proteiny nebo enzymy (Comai 2005). Alespoň dočasnou výhodou by mohlo být například i získání autokompatibility, které je často přímo spojováno s polyploidizací (Barringer 2007).

Nevýhody či problémy polyploidů jsou velice rozmanité. Patří mezi ně například problémy s rozchodem chromozómů při meióze a tvorba gamet schopných oplození, dále problémy s genovou expresí a epigenetickou nestabilitou. Většina těchto problémů a některé další, jako např. problémy s uchycováním polyploidů v diploidních populacích (tj. nevýhoda malých čísel) nebo životaschopnost a fertilita lichých polyploidů (tj. triploidní blok), budou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách.

2.2.1 Princip vyloučení minoritního cytotypu

To, že polyploidy je možné najít téměř v jakékoliv rostlinné čeledi a odhaduje se, že až 70 % všech rostlin jsou polyploidi (Lewis 1980; Masterson 1994), je poněkud v rozporu s tvrzením, jak složité by pro nově vzniklé polyploidy mělo být uchycení se v populaci svých diploidních předků a jejich následná expanze. Levin (1975) vyslovil hypotézu vyloučení minoritního cytotypu (angl. minority cytotype exclusion), v češtině též hypotéza „nevýhody malých čísel“ podle Briggs a Walters (2001).

Princip vyloučení minoritního cytotypu je založen na myšlence frekvenčně závislé selekce vůči méně početnému či vzácnému cytotypu. Děje se tak především proto, že většina pylu je na polyploidy přenesena z častějšího diploidního cytotypu, a polyploidi (tento model byl vytvořen pro autotetraploidy) nejsou schopni produkce dostatečně velkého množství životaschopných potomků jejich vlastní ploidie (Levin 1975, 2002). Nevýhoda malých čísel spočívá hlavně v tom, že křížení mezi jedinci různých ploidních úrovní je neúčinné, většinou totiž dochází k aborci semen, k tvorbě semen neschopných vyklíčit, semenáčky nepřežijí do dospělosti, nebo dojde ke snížení či úplné ztrátě fertility hybridů (Ramsey and Schemske 1998). K vyloučení minoritního cytotypu z populace by mělo dojít i v situaci, kdy je zastoupení cytotypů jen málo vychýlené z poměru 1:1. Nemusí však jít pouze o vymizení polyploidů. Pokud jsou polyploidi v převaze, může dojít i k vyloučení diploidů ze smíšené populace (Levin 2002). Tato myšlenka se poprvé objevila v práci Fowler a Levin (1984), kde autoři na cytotypově smíšené populaci aplikovali klasický model Lotka-Volterra (upravený pro účely studia nevýhody malých čísel), a potvrdili, že polyploidi vskutku mohou kompetičně vyloučit diploidy, avšak samotná vyšší konkurenceschopnost polyploidů nemusí být dostačující. Tato hypotéza byla potvrzena například na srze *Dactylis glomerata* ve studii Maceira *et al.* (1993). Předpokladem pro kompetiční překonání diploidů polyploidy je zaprvé alespoň částečná separace ekologických nik, která zabrání meziploidnímu křížení, a zadruhé existence vyšší schopnosti kompetice polyiploidů. U srhy *Dactylis glomerata* se tyto vyšší kompetiční schopnosti projeví např. rychlejším růstem listů v období brzkého jara, dřívějším a častějším kvetením a vyšší váhou semen.

Polyploidi se od svých diploidních předků mohou lišit ve své morfologii, fenologii, ale i fyziologii, což může podpořit různé mechanismy, jak překonat nevýhodu malých čísel (Levin 1983).

První z těchto změn, které u polyploidů mohou nastat a přispět k překonání nevýhody malých čísel je ztráta autosterility (z angl. self-incompatibility) a následné samosprášení (autogamie), které rostlině zaručí oplození kompatibilní gametou, a to i za cenu možné imbrední deprese a ztráty genetické variability během několika generací (Husband *et al.* 2008). Barringer (2007) na základě srovnání reprodukčních systémů diploidů a příbuzných polyploidů z literatury ukázal, že ztráta autosterility a následné samosprášení je častější u polyploidů než u jejich diploidních předchůdců a zřejmě přímo souvisí s procesem duplikace genomu. Tato hypotéza byla experimentálně potvrzena i studiem diploidů a kolchicinem indukovaných tetraploidů u vrbovky *Chamerion angustifolium*, kde se ukázalo že nově vzniklí polyploidi po několik generací netrpí imbrední depresí (Husband *et al.*, 2008). Naopak v práci Mable (2004) žádná korelace mezi polyploidizací a evoluční ztrátou autosterility nebyla potvrzena.

Další možností, jak se vyhnout vyloučení minoritního cytotypu, je například agamospermie a další způsoby vegetativního množení, které polyploidi nečastěji preferují, obzvláště v případech lichých cytotypů (van Dijk and Bakx-Schotman 2004; De Storme and Geelen 2013; Herben *et al.* 2017). Agamospermie, proces rozmnožování se neoplozenými semeny, se vyskytuje u mnoha druhů i přesto, že s sebou nese nemalá rizika. Všechny rostliny, které se rozmnožily pomocí agamospermie, jsou klonem mateřské rostliny, a jelikož nedošlo k rekombinaci během tvorby gamet a potomstvo není geneticky variabilní, mohou být například snazším cílem pro patogeny (Briggs and Walters 2001). Kromě agamospermie mohou rostliny investovat i do klonálního růstu a rozšiřovat se např. úlomky oddenků, pacibulkami nebo jinými propagulemi, jako je tomu například u šmelu *Butomus umbellatus* (Brown and Eckert 2005) nebo trsti rákosovité (*Arundo donax*; Haddadchi *et al.*, 2013).

Nenáhodný přenos pylu v populaci může též hrát roli v udržení a méně zastoupeného cytotypu. Cytotypy se mohou lišit dobou kvetení (tj. změna jejich fenologie), může ale záviset i na věrnosti opylovačů a jejich preferencích (Levin 2002). U dlužichy *Heuchera glossularifolia* se projeví oba dva tyto fenomény. Cytotypy se vzájemně liší jak dobou kvetení (tetraploidi začínali kvést v průměru o 5 dní později než diploidi) tak květní morfologií (odlišná barva i velikost květů), což zřejmě ovlivnilo chování opylovačů. Šest z patnácti studovaných druhů opylovačů navštěvovalo preferenčně jeden z cytotypů (Segraves and Thompson 1999). Změna ve fenologii cytotypů v místech jejich společného výskytu ve smíšených populacích se projevila například i u jitrocele *Plantago media* (van Dijk *et al.* 1992), ovsíku *Arrhenatherum elatius* (Petit *et al.* 1997) nebo štírovníku *Lotus alpinus* (Gauthier *et al.* 1998).

Velmi častým jevem je i prostorové oddělení diploidů a polyploidů v důsledku rozrůznění jejich ekologických nik, ať už se jedná o jejich rozdílnou toleranci ke klimatickým podmínkám stanovišť, vodnímu režimu, množství živin či pH půdy. U řady druhů se prokázalo, že diploidní cytotyp lépe snáší chladnější podnebí, například u vrbovky *Chamerion angustifolium* (Mosquin 1967), tomky *Anthoxanthum odoratum* (Hedberg 1969) nebo chrpy *Centaurea jacea* (Hardy *et al.* 2000).

Dalším příkladem, kde cytotypy jednoho druhu rostou v ekologicky odlišných podmínkách, může být heřmánkovec nevonný (*Tripleurospermum inodorum*), jehož diploidi jsou adaptovaní na vlhké oceánické klima a tetraploidi preferují spíše kontinentální podmínky (Kay 1969). Cytotypy šmelu okoličnatého (*Butomus umbellatus*) se též do jisté míry liší svými ekologickými nároky, triploidi na rozdíl od diploidů lépe tolerují vysoký obsah živin ve vodě i v půdě, preferují teplejší podnebí a tolerují i substrát s vyšším pH (Hroudová and Zákavský 1993a).

V neposlední řadě může polyploidům pomoci k udržení se v populaci i jejich mnohonásobný nezávislý vznik (Soltis and Soltis 1999). Existují i příklady dalších mechanismů, jak mohou polyploidi překonat nevýhodu malých čísel, to však není hlavním tématem této bakalářské práce. Následující kapitoly se budou zabývat scénáři, které nastávají po tom, co polyploidi překonají veškerá úskalí, kterým čelí při svém vzniku, a úspěšně se etablují. Zaměřím se v nich na princip reprodukční bariéry mezi cytotypy, především na triploidní blok, a též na možnosti genového toku mezi cytotypy.

3 Postzygotická reprodukční bariéra mezi diploidy a polyploidy

Hlavním důvodem, proč je polyploidizace považována za jeden z nejvýznamnějších speciálních procesů u rostlin je, že vede téměř okamžitě (tj. během jediné generace) ke vzniku efektivní postzygotické reprodukční bariéry (Otto and Whitton 2000). Při zpětném křížení polyploidní rostliny s rodičovským diploidním druhem zpravidla nevzniká životaschopné potomstvo (Köhler, Mittelsten Scheid & Erilova, 2010). Protože typickým a nejčastějším případem je vznik takovéto reprodukční bariéry mezi diploidy a tetraploidy, jejichž křížením by mělo vznikat triploidní potomstvo, tuto reprodukční bariéru nazýváme triploidním blokem (Marks 1966). Stejně principy lze však aplikovat i pro vyšší ploidní úrovně, např. křížení tetraploidů s hexaploidy (Hülber *et al.* 2015), a lze předpokládat, že platí obecně, pokud má vznikající hybridní potomstvo lichý počet chromozómových sad.

Postzygotická reprodukční izolace nastává až poté, co dojde ke splnutí samčí a samičí gamety a zpravidla má podobu snížení fitness (tj. vitality nebo fertility) vznikajících mezidruhových hybridů (Flegr 2009). Přestože se tato práce zabývá především postzygotickými reprodukčně izolačními mechanismy, u rostlin se často můžeme setkat i s mechanismy prezygotickými. Prezygotická reprodukční izolace brání již oplození a mezi její příklady patří odlišná doba kvetení rodičovských druhů (tj. jejich rozdílná fenologie), prostorová nebo ekologická separace druhů nebo odlišné mechanismy přenosu pylu. Prezygotické RIM (= reprodukčně izolační mechanismy) se uplatňují i v utváření bariér mezi diploidy a polyploidy (Petit *et al.* 1999; Kolář *et al.* 2017). Tyto mechanismy budou představeny na několika případových studiích. Diploidní a tetraploidní cytotypy štirovníku alpského (*Lotus alpinus*) jsou kromě triploidního bloku odděleny ještě prostorově (diploidní cytotyp se vyskytuje ve vyšších nadmořských výškách) a související změnou doby kvetení (tetraploidi

v nižších nadmořských výškách kvetou o měsíc dříve než diploidy rostoucí v extrémnějším podmínkách; Gauthier *et al.*, 1998). U ovsíku vyvýšeného (*Arrhenatherum elatius*) zabraňují genovému toku též především prezygotické RIM, a to téměř dokonalé oddělení doby kvetení diploidů a tetraploidů i zvýšená míra samoopylení u obou cytotypů (Petit *et al.* 1997). Také u tomky alpské (*Anthoxanthum alpinum*) je triploidní blok mezi diploidy a autotetraploidy posílen diferenciací ekologických nik cytotypů (Felber-Girard *et al.* 1996).

Postzygotické RIM mohou vytvářet selekční tlak a přispět tak ke vzniku prezygotických RIM (Flegr 2009). Tento jev byl popsán jako model posílení, tzv. reinforcement, a byl pozorován nejen u zvířat, ale i v polyploidních komplexech rostlin. U obou trav zmíněných v předchozím odstavci se reinforcement pravděpodobně projevuje. U ovsíku je to v podobě zvýšené míry samoopylení v kontaktní zóně cytotypů (Petit *et al.* 1999), stejný trend byl odhalen i v kontaktní zóně cytotypů tomky, avšak přibyla k němu i vyšší míra ekologické diferenciace cytotypů než v okolních cytotypově uniformních populacích (Felber-Girard *et al.* 1996). Dalším druhem, u kterého by se mohl projevovat reinforcement, je starček *Senecio carniolicus*, v jehož sekundárních kontaktních zónách se sympatrickým výskytem diploidů, tetraploidů a hexaploidů byla prokázána výrazná ekologická diferenciace cytotypů, vyšší než v cytotypově uniformních oblastech (Sonnleitner *et al.* 2016).

Mezi mechanismy pre- a postzygotické reprodukční izolace ale není rozdíl jen v odlišném načasování jejich realizace. Lowry *et al.* (2008) na základě analýzy 19 studií popisujících různé reprodukčně izolační mechanismy uvádí, že účinnost prezygotických RIM v zabránění genovému toku je $83,8 \pm 5,6$ % (průměr \pm směrodatná odchylka), na rozdíl od postzygotických RIM, jejichž efektivita je přibližně dvakrát nižší, tj. $40,7 \pm 18,1$ %. V již zmíněné studii Lowry *et al.* (2008) však nebyla zahrnuta data z polyploidních komplexů, ač zmiňují reprodukční izolaci mezi diploidy a polyploidy, zejména triploidní blok, jako důležitý faktor v evoluci rostlinných druhů. Je tedy možné se domnívat, že triploidní blok by, alespoň v některých případech, mohl být silnější překážkou hybridizace než klasické postzygotické RIM, které se realizují mezi diploidními druhy, obzvláště bereme-li v potaz možnou asymetrii v účinnosti triploidního bloku (např. Stoute *et al.*, 2012). Nicméně, prezygotické ani postzygotické RIM zřejmě nejsou dostatečně silné na to, aby cytotypy či různé druhy zcela reprodukčně izolovaly a mezi rostlinami může docházet ke genovému toku, kterému se budu detailněji věnovat ve třetí kapitole.

Dalším specifickým postzygotickým RIM je jejich častá asymetrie, kdy fitness vzniklých hybridů záleží do značné míry na směru křížení. Příkladem asymetrie postzygotických RIM může být „efekt rodičovských zájmů“, při němž se rozdílná ploidie rodičovských rostlin projeví na životaschopnosti či fertilitě vzniklého hybridu. Tak tomu je například u brukve zelné (*Brassica oleracea*), u které dochází k asymetrickému triploidnímu bloku při interploidním křížení, v tomto případě k aborci semen, u kterých je mateřskou rostlinou diploid a otcovskou tetraploid. Při křížení opačným směrem (matka tetraploid, otec diploid) semena vznikají (Stoute *et al.* 2012). Problematika triploidního bloku a efekt rodičovských zájmů budou více rozebrány v navazujících kapitolách. Z již

zmíněné studie Lowry *et al.* (2008) vyplývá, že i prezygotické RIM mohou být do jisté míry asymetrické, a to přibližně třikrát méně než postzygotické.

3.1 Mechanismy triploidního bloku

V této kapitole budou rozebrány hlavní mechanismy triploidního bloku, který je příkladnou ukázkou postzygotické reprodukční izolace při křížení různých cytotypů. Postupně budou probrány různé fáze, ve kterých se může manifestovat, od aborce triploidních semen, které je v literatuře věnována jednoznačně největší pozornost, přes omezení vitality triploidních rostlin až k problémům s jejich fertilitou. Levin (1971) ve své práci o reprodukční izolaci u rostlin zmiňuje kromě snížení životaschopnosti a fertility hybridů ještě jeden mechanismus postzygotické RIM, a sice hybridní rozpad. Tento fenomén se většinou neprojevuje hned v F1 generaci. Při dalším křížení hybridů mezi sebou nebo s jejich rodičovskými druhy dochází k postupné změně v jejich chromozómových sádkách, které přestávají být kompletní. Již v F2 generaci mohou hybridní rostliny obsahovat určité chromozomy výhradně od jednoho či druhého druhu a v mnoha případech jim chybí geny, které byly přítomny na chromozómu, který byl nahrazen. V této chvíli se začíná projevovat genová inkompatibilita (Flegr 2009).

U živočichů může dojít k projevům selhání už ve stádiu zygoty nebo časném stádiu vývoje embrya (Haig and Westoby 1991). U rostlin je také kritickou fází vývoj embrya, který je však závislý především na správném vývoji a funkci endospermu, živného pletiva semene (Haig and Westoby 1991). Narušení tvorby endospermu je tedy jednou z možných variant, jak postzygoticky zabránit interploidnímu nebo interspecifickému křížení (Haig and Westoby 1991; Scott *et al.* 1998; Kradolfer *et al.* 2013; Lafon-Placette and Köhler 2015). Další možností, kromě snížení vitality hybridů, může být snížení jejich fertility, například v důsledku neschopnosti vytvářet euploidní gamety (Levin 1971). O této problematice bude více řečeno v následujících kapitolách.

3.1.1 Kolaps vývoje triploidních semen

Triploidní blok se často realizuje v endospermu, živném pletivu semene (Köhler *et al.* 2010). Endosperm je pletivo, které má poměrně krátkou životnost a je omezeno pouze na období, kdy je rostlina ve fázi semene. (Costa *et al.* 2004). Přesto je jeho úloha nenahraditelná. Dokonce i struktura endospermu je velice podobná u všech krytosemenných rostlin (Costa *et al.* 2004). Při dvojitém oplození krytosemenných splyne první spermatická buňka s vaječnou buňkou za vzniku diploidního embrya, triploidní živné pletivo endosperm vzniká po splynutí druhé spermatické buňky s diploidním centrálním jádrem zárodečného vaku (Hamamura *et al.* 2012). Pro správný vývoj endospermu jsou stěžejní tři sady chromozomů v jádrech jeho buněk: dvě původem z mateřského centrálního jádra (2m) a jedna přinesená otcovskou gametou (1p; Haig & Westoby, 1991; Scott *et al.*, 1998). Během interploidního křížení je ale poměr 2m:1p narušen a může způsobit problémy jak při tvorbě embrya tak endospermu (Scott *et al.* 1998).

Již od počátku studia postzygotické reprodukční izolace se uvažovalo o nesprávném vývoji endospermu jako o možné příčině hybridní neživotoschopnosti (Schatlowski and Kohler 2012). Podle studie Nishiyama & Inomata (1966), měl být poměr $2m : 1p$ nezbytnou podmínkou pro vytvoření funkčního endospermu. Kdykoliv byl tento poměr narušen (např. při křížení diploidů s jejich autotetraploidy), došlo během několika dní ke kolapsu endospermu. O 14 let později byla u rodu *Solanum* popsána interploidní křížení, která byla úspěšnější než hybridizace na stejné ploidní úrovni. Byla na jejich základě vyslovena hypotéza „Endosperm balance number“ (dále jen EBN), která sice potvrdila důležitost poměru $2m : 1p$, ale také upozornila na možnou přítomnost imprintingu, tedy selektivního umlčení některých genů / genomů, které by mohlo také vést k vychýlení z poměru $2m : 1p$ (Johnston *et al.* 1980). Každý druh má své specifické EBN, též možno říci svoji efektivní ploidní úroveň, která však nemusí vždy odpovídat chromozomální ploidní úrovni. EBN je druhu přiřazeno tak, aby při křížení byl v endospermu zachován poměr $2m:1p$. Vývoj endospermu a celého semene probíhá správně, pokud se kříží dva druhy nebo dva cytotypy, které mají stejné EBN. Pokud u druhu se známým EBN dojde k polyploidizaci, jeho EBN se zdvojnásobí. Stejně tak k tomu dochází u neredukovaných $2n$ gamet. Aby se tedy neredukovaná gameta, ať už samčí nebo samičí, mohla úspěšně podílet na reprodukci, musí se potkat s redukovanou gametou druhu, který má dvakrát vyšší EBN. Příkladem může být diploidní lilek *Solanum jamesii*, který má známou hodnotu EBN 1, jeho neredukovaná gameta má ale EBN 2, úspěšně křížit se tak může například s diploidním *Solanum amabile* nebo tetraploidním *Solanum acaule*, jejichž EBN nabývá hodnoty 2. Při křížení rostlin s rozdílnými EBN dochází k vychýlení z poměru $2m:1p$, v případě neredukované spermatické buňky na $2m:2p$, v případě neredukované vaječné buňky $4m:1p$ (Hanneman 1994; Levin 2002).

Hypotéza EBN a genomový imprinting byly potvrzeny i studií Lin & Brink (1984). Křížení probíhalo za použití *ig* mutantů (= *indeterminate gametophyte*) u kukuřice. Díky této mutaci autoři získali mateřské rostliny s různým počtem jader v centrální buňce zárodečného vaku a jejich ploidie se pohybovala v rozmezí od diploidní po nonaploidní. Pro pokus byly použity diploidní mateřské rostliny a dva různé cytotypy otcovských rostlin (diploidní a tetraploidní), z jejichž křížení byla získána semena s diploidními nebo triploidními embryi (v závislosti na ploidii otcovské rostliny). Endosperm těchto semen však měl různou ploidní úroveň a též různé poměry rodičovských genomů (tj. $m:p$). Při křížení s diploidní otcovskou rostlinou se vyvíjela správně jen semena s triploidním ($2m:1p$) a tetraploidním endospermem ($3m:1p$). Semena s tetraploidním endospermem však byla dvakrát menší než s triploidním, avšak velikost semen neměla výrazný vliv na vývoj embrya ani na jejich klíčivost. Křížení s tetraploidní otcovskou rostlinou, jejíž pylová zrna obsahovala téměř výhradně diploidní spermatické buňky, nejlépe přežívala semena s hexaploidním endospermem v poměru $4m:2p$, která byla abnormálně velká. Semena s jakoukoli jinou ploidí endospermu (od tetra- po heptaploidní) inklinovala k aborci již po dvanácti dnech od opylení. Lin & Brink (1984) uvedli závěrem, že kritickým pro tvorbu normálních životoschopných semen je právě poměr maternálního a paternálního genomu $2m:1p$. Dále pak uvádí, že celková ploidie endospermu ani poměr mezi ploidí semene

a endospermu pro správný vývoj semene kritické nejsou. Lin & Brink (1984) rozvedli též teorii genomového imprintingu, protože vitální byla i některá semena s tetraploidním endospermem a to v poměru 3m:1p, semena s poměrem 2m:2p byla neživotaschopná, což značí, že při tvorbě endospermu záleží na tom, který z rodičů je polyploidní. Opravdový náhled do podstaty fungování triploidního bloku však umožnily až recentní molekulárně genetické studie. Imprinting genů v endospermu byl u kukuřice prokázán i molekulárně již v devadesátých letech (Lund *et al.* 1995). Jednalo se o zásobní proteiny v endospermu, které byly transkribovány pouze v případě, že byly geny přeneseny z mateřské rostliny a jejich promotory nebyly methylované.

Endosperm lze rozdělit na tři až čtyři funkční domény: rozhraní mezi mateřským pletivem a pletivem potomka, rozhraní embrya a endospermu, epidermis a u některých taxonů i zvláštní zásobní pletivo obsahující velké množství škrobu (Costa *et al.* 2004). Právě na rozhraní mezi mateřskými pletivy a pletivy embrya dochází pomocí specializovaných buněk, které obsahují velké množství mitochondrií a rozsáhlou síť hrubého endoplazmatického retikula, k předávání zásobních látek (především sacharózy) z mateřské rostliny do semene (Becraft and Gutierrez-Marcos 2012). Buňky obklopující embryo pak získané živiny předávají přes složité membránové komplexy přímo do buněk embrya a podporují tak jeho růst a diferenciaci (Becraft and Gutierrez-Marcos 2012). Chyba ve vývoji endospermu, která se často vyskytuje při hybridizaci různých cytotypů (druhů), okamžitě způsobuje zastavení růstu embrya a aborci semen (Lafon-Placette and Köhler 2016). Většina studií o mortalitě semen v důsledku hybridizace a kolapsu endospermu byla realizována na čeledi Brassicaceae (např. Köhler *et al.*, 2003; Lafon-Placette and Köhler, 2015; McKeown *et al.*, 2011; Stoute *et al.*, 2012), ale tento fenomén se vyskytuje napříč mnohými čeleděmi krytosemenných rostlin, například u Poaceae (Sato *et al.* 1993), Onagraceae (Husband and Sabara 2003), Solanaceae (Marks 1966) a dalších. Hlavní příčinou kolapsu endospermu je zřejmě genomový imprinting, který reguluje dozi genů rodičů obou pohlaví (Haig & Westoby, 1991; Kradolfer *et al.*, 2013).

Jak již bylo zmíněno výše, endosperm je orgán vyžadující poměr dvou maternálních genomů ku jednomu paternálnímu. Haig & Westoby (1989) vyslovili hypotézu rodičovsky specifické genové exprese (angl. parent-specific gene expression). Podle této a dalších studií (Johnston *et al.*, 1980; Lin & Brink, 1984; Nishiyama & Inomata, 1966) jde o konflikt mezi mateřskou rostlinou a jejími potomky, respektive otcovskými geny přítomnými v genomu jejich potomků. Princip rodičovského konfliktu spočívá v tom, že si každý z rodičů chce maximalizovat svou fitness. Z evolučního hlediska je zájmem matky rovnoměrně investovat živiny do všech svých potomků (které má s více otci) a dosáhnout tak co nejvyšší inkluzivní fitness, zatímco zájmem otce je získat co nejvíce živin pro své vlastní potomky na úkor ostatních (Haig and Westoby 1991). Rostliny proto využívají paternálně exprimované geny, které zvyšují přísun živin z matky do potomků, a maternálně exprimované geny, které omezují a rovnoměrně rozdělují přísun živin mezi potomky (Lafon-Placette and Köhler 2016).

Hypotéza konfliktu rodičovských zájmů dále podnítila výzkum genomového imprintingu prostřednictvím sledování rozdílů v genové expresi (Scott *et al.* 1998; Lafon-Placette and Köhler

2016). Genomový imprinting (dále jen imprinting) je jev, při kterém dochází prostřednictvím epigenetických modifikací ke změně míry genové exprese potomka v závislosti na tom, od kterého rodiče byl daný gen zděděn. Imprinting je realizován prostřednictvím několika typů epigenetických modifikací, jako je modifikace chromatinu (methylace lysinu 27 na histonu 3) nebo methylace DNA (především promotorů genů; Brannan and Bartolomei, 1999; Jullien and Berger, 2009; Köhler and Makarevich, 2006). U rostlin se imprinting vyskytuje pouze v endospermu. Ve vegetativních nebo jiných generativních pletivech prozatím objeven nebyl. K expresi pohlavně závislých alel dochází u obou pohlaví již během gametogeneze (Jullien and Berger 2009). Nejvíc získaných informací o mechanismech genomového imprintingu máme prozatím z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a kukuřice seté (*Zea mays*). V následujícím úseku budou na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* demonstrovány základní molekulární mechanismy parentálního imprintingu v souvislosti s triploidním blokem.

Na základě studia mutantních fenotypů semen *Arabidopsis thaliana* v imprintovaných genech, které jsou fenotypově velmi podobné semenům z meziploidních křížení u huseníčku (s maternálním nebo paternálním genomem navíc), je možné tyto geny rozdělit do dvou skupin, a to na maternálně exprimované: *MEA* (*MEDEA*) a *FIS2* (*FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2*) a na paternálně exprimované: *PHE1* (*PHERES1*; Kinoshita, 2007). *MEA* a *FIS2* jsou dvěma podjednotkami evolučně konzervovaného Polycomb Group (PcG) komplexu *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED* (*FIS*). Tento komplex stojí za trimetylací lysinu 27 na histonu 3 (Köhler *et al.* 2010). Exprese maternálních genů je závislá na DNA glykosiláze *DEMETETER* (*DME*), která zprostředkovává odstranění metylových skupin na histonu 3 (Gehring *et al.* 2006; Jullien *et al.* 2006). Paternálně exprimovaný *PHERES1* je MADS box protein typu I a jeho exprese je reprimována právě některými podjednotkami PcG komplexu *FIS*, hlavní úlohu zřejmě hraje protein *MEDEA* (Köhler *et al.* 2003). Regulace těchto mechanismů je zřejmě závislá na dózi genů a zcela správně funguje, jen pokud jsou genomy v již mnohokrát zmíněném poměru 2m:1p (Kinoshita 2007).

Maternálně exprimované geny *MEA* a *FIS2* brání proliferaci buněk endospermu, naopak paternálně specifický *PHE1* proliferaci buněk endospermu podporuje (Kinoshita 2007). U huseníčku *Arabidopsis thaliana* tak byla potvrzena hypotéza konfliktu rodičovských zájmů i na molekulární úrovni. U kukuřice *Zea mays* byl též potvrzen parentálně specifický genomový imprinting (Lund *et al.* 1995; Waters *et al.* 2011). Maternálně a paternálně exprimované geny kukuřice vykazují i jistou příbuznost s geny u huseníčku, ale některé se vyskytují například ve více kopiích nebo nejsou svými nejbližšími homology. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že se imprinting vyvíjel velmi rychle a nezávisle na předchozí funkci genů, rozdílný charakter imprintingu by dokonce mohl být příčinou reprodukčních bariér mezi různými druhy (Kinoshita 2007; Florez-Rueda *et al.* 2016).

Obdobná situace, kdy jsou semena s maternálním genomem navíc malá a jejich endosperm ukončil vývoj předčasně, a naopak semena, u kterých přebývá jeden paternální genom, mají nevyvinutá embrya kvůli nadměrné proliferaci a špatné funkčnosti buněk endospermu, byla prokázána

u brukve *Brassica oleracea* (Stoute *et al.* 2012). U huseníčku *Arabidopsis thaliana*, který je samosprašný. Fenotyp jeho semen je na dózi parentálně specifických genů závislý, avšak silný triploidní blok se u huseníčku nevyskytuje (Scott *et al.* 1998). U brukve zelné se triploidní blok projevil, a to u kříženců diploidní matky a tetraploidního otce. V těchto semenech docházelo k zastavení vývoje embrya již v globulárním stádiu. Jejich endosperm se vyvíjel abnormálně oproti semenům všech ostatních typů křížení, a již po 19 dnech po opylení podléhal degradaci (Stoute *et al.* 2012). Studium transkriptomu ortologních lokusů mezi druhy *Brassica oleracea* a *Arabidopsis thaliana* neprokázalo žádnou výraznou odchylku brukve od huseníčku v případě maternálně specifických genů, ke změně, která způsobila letalitu semen s tetraploidním otcem, muselo tedy dojít mezi paternálně specifickými geny (Stoute *et al.* 2012).

Funkce genomového imprintingu, přestože zde byla demonstrována jen na pár druzích, se zdá být u krytosemenných rostlin principiálně obdobná, i když se u různých, a to i blízce příbuzných druhů, jeho konkrétní molekulární mechanismy liší (McKeown *et al.* 2011; Stoute *et al.* 2012; Mozgova *et al.* 2015; Florez-Rueda *et al.* 2016). Právě parentálně specifický imprinting, především genů regulujících proliferaci buněk endospermu, nejspíše stojí za kolapsem vývoje triploidních semen – triploidním blokem.

3.1.2 Omezení životaschopnosti a vitality triploidních hybridů

Omezení vitality triploidních hybridů by na první pohled mohlo naznačovat, že triploidní rostliny mají problémy s růstem nebo přežíváním, a to například z důvodu lichého počtu sad chromozómů v buňkách. Samotný lichý počet chromozómových sad v somatických pletivech ale zdá se nečiní triploidům zásadní problémy, pokud jsou schopni překonat již zmíněné komplikace na úrovni semen a vyklíčí. Triploidi (ale i vyšší liché ploidní úrovně) jsou běžnou součástí přirozených cytotypově smíšených populací rostlin (Ramsey and Schemske, 1998; Husband, 2004; Kolář *et al.*, 2017) a právě díky svým třem sadám chromozómů, většímu množství genetické informace (DNA) a v důsledku toho i větším buňkám, mohou být dokonce větší a odolnější než jejich diploidní rodiče, a v některých případech i než jejich rodiče tetraploidní (Miller *et al.* 2012; Wang *et al.* 2016). Přestože tetraploidi mají více DNA, v F1 generaci se může projevit heterózní efekt, který by mohl vysvětlit, proč jsou někteří triploidní hybridy větší a životaschopnější i v porovnání se svými tetraploidními rodiči.

Životaschopní triploidní hybridy jsou ale popisováni v přírodě i u jiných druhů, například šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus*), u kterého byl potvrzen diploidní a triploidní cytotyp (Krahulcová and Jarolímová 1993). Klíčivost semen a životaschopnost semenáčků je nízká u obou cytotypů, avšak diploidi tento problém kompenzují vysokou tvorbou semen, zatímco triploidi kvůli nízké fertilitě (vytvářejí pouze malé množství semen) investují intenzivněji do biomasy a vegetativního rozmnožování pomocí pacibulek a oddenku (Hroudová and Zákravský 1993b; Brown and Eckert 2005). Dalšími druhy, u kterých se životaschopní triploidi přirozeně vyskytují, jsou například heřmánkovec nevonný (*Tripleurospermum inodorum*), v jehož cytotypově smíšených populacích

triploidi činí téměř 8 % (Čertner *et al.* 2017), jestřábník hadinec (*Hieracium echinoides*), u kterého bylo prokázáno, že se triploidi úspěšně množí jak mezi sebou tak s ostatními cytotypy a nejspíše tak dochází i ke genovému toku mezi cytotypy (Peckert and Chrtek 2006).

3.1.3 Omezení fertility triploidních hybridů

Dalším způsobem realizace triploidního bloku je snížení fertility nebo téměř úplná sterilita meziploidních hybridů (Ramsey and Schemske 1998, 2002). Tento problém spočívá v nemožnosti rozdělit rovnoměrně lichý počet chromozomových sad mezi vznikající pohlavní buňky při redukčním dělení. U triploidů, ale analogicky i u jiných lichých polyploidů, se předpokládá takřka výhradně produkce aneuploidních gamet, tedy gamet s neúplnými sadami chromozómů, které budou nejpravděpodobněji obsahovat počet chromozómů odpovídající polovině tří sad (nejčastěji $3x/2$, poté $3x/2-1$ atd.; Ramsey and Schemske, 1998). Neustálený počet chromozómů v jádrech je příčinou omezené životaschopnosti většiny gamet a jejich časté aborce, kvůli čemuž byli triploidi dlouho považováni za sterilní. Ukazuje se však, že triploidi jsou schopni produkovat i malé procento euploidních (haploidních, diploidních i triploidních) gamet, které jsou schopné se podílet na další reprodukci a umožňují triploidům i zpětné křížení s jejich diploidními a tetraploidními rodiči (Ramsey and Schemske 1998; Husband 2004). Genovému toku mezi cytotypy se však bude podrobněji věnovat následující kapitola o prolomení reprodukční izolace.

Přestože je snížená fertilita meziploidních hybridů (především lichých polyploidů) obecně známým fenoménem, existuje zatím jen omezené množství prací demonstrujících reálnou situaci v přírodě. Omezení fertility hybridů se projevuje především neživotaschopností a omezeným počtem jejich gamet. U huseníčku *Arabidopsis thaliana* bylo u triploidních hybridů tetraploidní matky a diploidního otce prokázáno razantní snížení životaschopnosti samičích gamet, ale i snížení jejich počtu, zatímco produkce a životaschopnost samčích gamet byla u triploidů stejná jako u jejich rodičů (Duszynska *et al.* 2013). Opačný případ, kdy hybridizace mezi diploidy a tetraploidy způsobila výrazné snížení samčí fertility, byl objeven u srhy *Dactylis glomerata* (Sato *et al.* 1993). Celkem 63 % všech studovaných triploidních hybridů srhy trpělo samčí sterilitou, 31 % vykazovalo alespoň částečnou fertilitu a pouhých 6 % bylo z větší části fertálních. K výraznému omezení fertility dochází i u triploidů druhu *Butomus umbellatus* (Krahulcová and Jarolímová 1993), a to opět především kvůli problémům spojeným s rozchodem chromozómů při meióze. Opylovací experimenty však ukázaly, že triploidní jedinci nejsou zcela sterilní, protože při reciprokém křížení diploidů a triploidů vznikala životaschopná semena. Dokonce i někteří aneuploidní jedinci byli životaschopní.

Burton and Husband (2000) jako jedni z mála srovnávali fenotyp a celkovou fitness diploidů, triploidů a tetraploidů napříč různými životními stádii, a to u vrbovky úzkolisté (*Chamerion angustifolium*). Autoři celkem provedli čtyři typy křížení, a to diploid \times diploid, diploid \times tetraploid, tetraploid \times diploid, tetraploid \times tetraploid (v pořadí matka \times otec). Triploidní hybridy, kteří vznikli v obou směrech hybridních křížení, produkovali v dospělosti signifikantně nižší počet semen, a jejich

semena měla nižší klíčivost než semena diploidů nebo tetraploidů. Oproti diploidům však měly devět týdnů staré rostliny více biomasy, a to srovnatelně s tetraploidy. Dalším signifikantním rozdílem byla tvorba životaschopného pylu, tedy snížení fertility již dospělých triploidů. Fertilita byla nízká u potomků obou směrů křížení, ale nejnižší při křížení tetraploidní matky s diploidním otcem. Pokud se triploidnímu semenu podařilo vyklíčit, byli triploidi životaschopní a ve velké míře přežívali až do času kvetení, avšak jejich relativní celková fitness byla pouze 9 % (vztaženo k diploidním rostlinám s nejvyšší fitness).

Omezená fertilita triploidních hybridů však nemusí být vždy nepřekonatelnou překážkou, projevuje se totiž jen u sexuálně se množících druhů (Kolář *et al.* 2017). Triploidní pampelišky rodu *Taraxacum* tvoří převážně sterilní pylová zrna a ve většině případů se tak nemohou křížit s jedinci diploidního cytotypu. Triploidi se však množí převážně partenogeneticky pomocí agamospermie (Meirmans *et al.* 2003). Stejně tak je tomu i u druhu *Arnica cordifolia* z čeledi Asteraceae. Triploidi i tetraploidi tohoto druhu mají nízkou fertilitu, a též se rozmnožují převážně pomocí agamospermie (Kao and Parker 2010).

Ať už se jedná o kolaps vývoje semen, omezení vitality triploidních hybridů, a nebo jejich fertility, efektivita mechanismů triploidního bloku je napříč různými rostlinnými druhy velmi variabilní. Triploidní blok téměř nikdy není kompletní a mezi cytotypy nezřídka vznikají životaschopní i částečně fertilitní triploidní hybridy.

Jedním z extrémních případů, kdy je triploidní blok téměř úplný je chrastavec *Knautia arvensis* z čeledi Caprifoliaceae. V primární kontaktní zóně diploidního a tetraploidního cytotypy byl mezi více než 4 000 jedinci nalezen jen jeden triploid (Hanzl *et al.* 2014). Tento jedinec byl třetím do té doby objeveným triploidem u druhu *Knautia arvensis*. Opačným extrémem je například jestřábník *Hieracium echinoides*. Všechny nalezené cytotypy (diploidní, triploidní, tetraploidní a pentaploidní) jsou fertilitní a velmi úspěšně se mezi sebou kříží (Peckert and Chrtek 2006). Je tedy možné, že se u jestřábníku nevyskytuje žádná postzygotická reprodukční bariéra způsobená polyploidizací.

Jak již bylo dříve zmíněno, u velkého počtu druhů se triploidní blok realizuje jen částečně a velmi často záleží na směru křížení diploidů a tetraploidů, jako je tomu například u rodu *Brassica* (Stoute *et al.* 2012) a *Capsella* (Slotte *et al.* 2008). Mechanismy triploidního bloku však byly doposud studovány do hloubky jen na omezeném množství modelových druhů a je tedy předmětem dalšího studia zjistit více o tomto procesu z přirozených cytotypově smíšených populací planě rostoucích rostlin.

4 Prolomení reprodukční izolace

Vznik triploidů nemusí pro rostliny vždy znamenat okamžitou reprodukční izolaci mezi diploidy a tetraploidy (Soltis *et al.* 2003). Triploidní blok je téměř vždy neúplný a triploidi vznikající v meziploidních kříženích mohou dokonce genový tok mezi diploidy a tetraploidy zprostředkovávat.

Také role triploidů při vzniku tetraploidů a dalších cytotypů vyšší ploidní úrovně (tzv. hypotéza triploidního mostu) není zanedbatelná a je možné ji také považovat za určitou formu genového toku (Ramsey and Schemske 1998; Husband 2004; Henry *et al.* 2005).

Hybridní či kontaktní zóny cytotypů nacházíme mezi různými druhy napříč taxonomickými skupinami a dělí se na dva typy: primární a sekundární. V primárních kontaktních zónách polyploidie vznikají ze svých diploidních předků, a to buď mezidruhovou hybridizací (allopolyploidizace) nebo splynutím neredukovaných gamet v rámci jednoho druhu (autopolyploidizace). Pokud se však cytotypy dostanou do kontaktu poté, co byly geograficky odděleny, a k jejich diferenciaci docházelo v allopatrii, jedná se o sekundární kontaktní zónu. Kontaktní zóny nám poskytují náhled do evoluce jednotlivých cytotypů, informace o izolačních mechanismech mezi nimi, ale také o překonání reprodukční bariéry (Hülber *et al.* 2015). Genový tok mezi cytotypy je studován především v sekundárních kontaktních zónách, na cytotypech, u kterých po čas jejich oddělení mohlo dojít k fixaci genetických rozdílů a vzniku nezávislých lokálních adaptací (Petit *et al.* 1999).

4.1 Mechanismy genového toku

Pokrok v technologii molekulárních markerů umožnil rozsáhlý náhled do problematiky polyploidní speciace. Na rozdíl od tradičního pohledu na polyploidizaci jako případ vzniku nových druhů, při kterém se ustanoví okamžitá reprodukční bariéra, genetická struktura polyploidních komplexů ukázala, že polyploidní speciace je v mnoha případech složitější, než se původně myslelo (Soltis *et al.* 1993). Sdílený polymorfismus mezi cytotypy a inkongruence mezi lokusy různých cytotypů byly původně vysvětlovány mnohonásobným vznikem polyploidů (Soltis *et al.* 1993; Segraves and Thompson 1999; Soltis and Soltis 1999). Pokud by totiž polyploidizace pokaždé způsobila okamžitou reprodukční bariéru, populace nově vzniklých polyploidů by čelily velmi silnému efektu hrdla láhve, a jejich genetická diverzita by byla velice nízká (Flegr 2009). Sdílený polymorfismus a genetická diverzita by však mohly být způsobeny i hybridizací, tedy genovým tokem mezi cytotypy, ke kterému došlo v minulosti nebo stále probíhá (Petit *et al.* 1999; Slotte *et al.* 2008; Jørgensen *et al.* 2011).

Petit *et al.* (1999) rozděluje ve svém review hybridy vznikající v kontaktních zónách do dvou kategorií. První typ hybridů se svou ploidií liší od obou rodičů, to znamená, že v případě kontaktu diploidů s tetraploidy vznikají triploidi. Triploidi, přestože většina gamet, které vytváří, jsou neživotoschopné nebo aneuploidní, tvoří i malé procento euploidních gamet (v průměru 3 % haploidních, 2 % diploidních, tvoří i neredukované triploidní gamety; Ramsey and Schemske, 1998). Díky tomuto malému množství euploidních gamet může dojít při křížení mezi triploidy k produkci životoschopných F₂ potomků, nebo mohou vznikat potomci při zpětných kříženích triploidů s diploidními nebo tetraploidními rodiči, což může vést i ke genovému toku mezi cytotypy (Chapman and Abbott 2010). Hybridy druhého typu mají stejnou ploidii jako jeden z rodičů, například když při křížení diploida s tetraploidem dojde ke splynutí dvou 2*n* gamet (gameta diploida bude neredukovaná), které vytvoří nového tetraploida. Ke genovému toku tedy může docházet přímo mezi diploidy

a tetraploidy nebo nepřímo přes triploidní hybridy (Bretagnolle and Thompson 1995; Ramsey and Schemske 1998).

Dle většiny studií dochází ke genovému toku spíše přes hybridy druhého typu, a to především z diploidů, kteří tvoří dostatečné množství neredukovaných gamet, do tetraploidů (Lumaret and Barrientos 1990; Van Dijk and Bakx-Schotman 1997). Genový tok zprostředkovaný přes hybridy prvního typu (triploidy) je ve většině případů obousměrný (Menken *et al.* 1995; Ramsey and Schemske 1998; Peckert and Chrtek 2006). Konkrétní příklady genového toku mezi cytotypy v přirozených populacích budou podrobněji rozebrány v následující podkapitole.

4.2 Empirická data o genovém toku mezi různými cytotypy z přírody

Ke genovému toku dochází několika různými způsoby, jak bylo naznačeno v předešlé podkapitole. Mechanismy genového toku se však mezi různými rostlinnými druhy liší, stejně tak jako intenzita genového toku nebo směr toku genů mezi populacemi různých cytotypů. Genový tok mezi cytotypy v přirozených populacích je stále předmětem zkoumání a pro účely této bakalářské práce bude představen na několika málo studiích, ve kterých byl genový tok mezi cytotypy jednoho druhu ale i mezi cytotypy druhů blízké příbuzných prokázán.

Přestože reprodukční bariéra způsobená omezením vitality či fertility hybridů napomáhá tvorbě ustálených populací jednotlivých cytotypů a případně i jejich diferenciaci, genový tok má též své výhody. Skrze genový tok se mezi cytotypy udržuje genetická diverzita, významná především pro polyploidy, může ale ovlivnit obě ploidie (Petit *et al.* 1999). Menken *et al.* (1995) podrobili izozymové analýze sexuálně se rozmnožující diploidy a fakultativně apomiktické triploidy smetánky lékařské (*Taraxacum* sect. *Ruderalia*). Populace diploidů byly takřka panmiktické. To znamená, že se přenosem pylu křížili jedinci z různých populací mezi sebou i na velké vzdálenosti. Genotypová diverzita u triploidů byla také překvapivě vysoká. Diploidi a triploidi sdíleli polymorfismus v izozymových lokusech, a v populacích diploidů i triploidů se objevovaly stejné vzácné alely, což značilo genový tok mezi cytotypy. U smetánky rodu *Taraxacum* se nejspíš jedná o obousměrný genový tok, který je zprostředkován redukovanými i neredukovanými ($2n$) samčími gametami diploidů a triploidů. Takto udržovaná genetická diverzita by v delším časovém měřítku mohla zajistit vyšší adaptabilitu a šanci na přežití obou cytotypů během výrazných změn v jejich životním prostředí (Menken *et al.* 1995; Petit *et al.* 1999; van Dijk and Bakx-Schotman 2004).

Dalším příkladem, kde dochází ke genovému toku pravděpodobně díky hybridům druhého typu, je rod *Senecio*, starček. Mezi diploidy druhu *Senecio squalidus* a tetraploidy druhu *Senecio vulgaris* dochází k tvorbě hybridů druhého typu a následně k adaptivní introgresi. Genovým tokem mezi těmito dvěma druhy došlo k vytvoření hybridů s novými adaptivními znaky, konkrétně ke změně květní morfologie (Chapman and Abbott 2010). Kromě těchto změn zapříčinila introgrese patrně i jejich ekologické rozrůznění (Petit *et al.* 1999; Chapman and Abbott 2010). Rozrůznění

ekologických nik způsobené hybridizací mezi cytotypy bylo zaznamenáno i u populací dalšího druhu starčku *Senecio carniolicus* (Hülber *et al.* 2015; Sonnleitner *et al.* 2016). Ačkoliv u tohoto druhu nebyl zaznamenán genový tok mezi diploidy a tetraploidy, ani diploidy a hexaploidy, v kontaktní zóně mezi tetraploidy a hexaploidy vznikali pentaploidní hybridy. Pomocí metody AFLP (angl. amplified fragment length polymorphism) byl následně prokázán jednosměrný genový tok z tetraploidů do hexaploidů zprostředkovaný právě pentaploidy. Ekologická nika pentaploidů se výrazně lišila od niky tetraploidů, nikoliv však hexaploidů (Hülber *et al.* 2015). Dalším druhem, kde byla zaznamenána diferenciace ekologických nik (v celosvětovém měřítku) způsobená introgresí z diploidů do tetraploidů je kokoška *Capsella bursa-pastoris* z čeledi Brassicaceae (Slotte *et al.* 2008; Han *et al.* 2015).

Jednosměrný genový tok byl prokázán i u několika dalších druhů, například mezi britskými populacemi diploidů druhu *Betula nana* a tetraploidů druhu *Betula pubescens*, dále mezi tetraploidy *Betula pubescens* a diploidy *Betula pendula* (Zohren *et al.* 2016). V sympatrických zónách výskytu allotetraloidního kávovníku *Coffea arabica* a jeho diploidního předchůdce *Coffea canephora* byl též zaznamenán genový tok z diploidů do tetraploidů analýzou délkových polymorfismů (AFLP) a alel mikrosatelitových lokusů (Mahé *et al.* 2007).

V přírodě je však možné najít i druhy, jejichž cytotypy se bez jakýchkoliv problémů kříží mezi sebou. Jedním z těchto druhů je i jestřábík *Hieracium echinoides* z čeledi Asteraceae, u kterého byl prokázán diploidní, triploidní, tetraploidní a pentaploidní cytotyp (Peckert and Chrtek 2006). K úspěšné hybridizaci dochází u jestřábíku mezi všemi cytotypy, a tak se dá předpokládat, že i ke genovému toku mezi nimi (Trávníček *et al.* 2011; Herben *et al.* 2016; Kolář *et al.* 2017).

Ke genovému toku mezi různými cytotypy jednoho druhu a cytotypy různých druhů v přírodě běžně dochází, i když se jeho intenzita značně liší případ od případu. Předmětem dalšího studia by tedy mělo být zjistit více o reprodukčních interakcích cytotypů a meziploidním genovém toku v kontaktních zónách cytotypů a odhalit převládající zákonitosti a trendy.

5 Modelový druh *Butomus umbellatus* L.

5.1 Biologické vlastnosti a ekologie modelového druhu

Šmel okoličnatý (*Butomus umbellatus* L.) je jediným druhem monotypické čeledi Butomaceae, která náleží do řádu žabníkotvaré (Alismatales). *Butomus umbellatus* je jednoděložná rostlina, která se běžně vyskytuje v mokřadních biotopech na většině území kontinentální Evropy, Britských ostrovů a temperátní Asie (Tutin *et al.* 1980). V 19. století byl šmel okoličnatý introdukován i do Severní Ameriky, kde se následně velmi rychle rozšířil, obzvláště v oblasti Velkých jezer, a je považován za invazní druh (Brown and Eckert 2005).

Šmel okoličnatý je až 150 cm vysoká vytrvalá mokřadní bylina s vodorovným plazivým oddenkem, z něhož střídavě vyrůstají ve dvou řadách tříhranné až zploštělé listy s čárkovanou

žilnatinou. Jeho květy jsou pravidelné, oboupohlavné, světle až tmavorůžové barvy. Skládají se z šesti okvětních lístků, devíti tyčinek na dlouhých nitkách a apokarpního gynecea tvořeného šesti plodolisty. Květenství, které je nejvýraznějším útvarem na rostlině, je zdánlivý okolík složený ze tří šroubelů, který se nachází na konci dlouhého stvolu. Plodem je souplodí měchýřků (Tutin *et al.* 1980).

Šmel okoličnatý je běžnou součástí litorálních společenstev stojatých a pomalu tekoucích vod. Většinou se vyskytuje na místech s kolísající hladinou vody, jako jsou břehy rybníků, přehradních nádrží, velkých i malých vodních toků, ale i trvale podmáčené deprese na polích a další stanoviště (Hroudová *et al.* 1996). Reprodukční úspěšnost šmelu je na měnící se výšce vodní hladiny značně závislá, odhalení dna je nezbytným předpokladem pro klíčení semen a růst semenáčků, způsob reprodukce ale do značné míry závisí na konkrétním cytotypu (Hroudová *et al.* 1996) a je tak detailně popsán v následující kapitole.

5.2 Cytotypová variabilita

U šmelu okoličnatého byl na základě karyologických analýz prokázán výskyt dvou cytotypů – diploidního ($2n = 26$) a triploidního ($2n = 39$; Krahulcová and Jarolímová, 1993; Tutin *et al.*, 1980). Oba cytotypy se od sebe do určité míry liší svými ekologickými nároky, množstvím vyprodukované biomasy i relativní investicí do generativního a vegetativního rozmnožování. Na území České republiky a Slovenska podle studií z 90. let výrazně převládá triploidní cytotyp, vyskytoval se na 82 lokalitách z 99 (83 %), zatímco diploidní populace byly nalezeny jen na zbývajících 17 lokalitách (Hroudová and Zákravský 1993a). Zdá se, že triploidi budou převládajícím cytotypem v celé Evropě, je však zajímavé, že v sekundárním areálu druhu v Severní Americe jsou častěji rozšířeni naopak diploidi (Brown and Eckert 2005). Cytotypově smíšené populace šmelu okoličnatého dlouho nebyly známy a byly objeveny až v nedávné době na území Východoslovenské nížiny, v oblasti řek Latorica, Ondava a Bodrog (Rydlo 2016). Ze 72 zkoumaných populací bylo 30 (42 %) cytotypově smíšených, 34 (47 %) čistě triploidních a 8 (11 %) diploidních. Právě tyto smíšené populace diploidů a triploidů budou předmětem výzkumu pro mou budoucí diplomovou práci.

V práci Hroudové a Zákravského (1993b) se diploidi od triploidů lišili svými stanovištními požadavky. Diploidi se častěji vyskytovali v chladnějších oblastech, zatímco triploidi na lokalitách s teplejším podnebím. Triploidi též vykazovali větší toleranci k vysokému obsahu živin ve vodě i v substrátu (eutrofní vody) a zároveň také větší toleranci k odlišnému pH substrátu než diploidi. Je však zajímavé, že v oblasti Východoslovenské nížiny tyto rozdíly mezi cytotypy nebyly potvrzeny a diploidi se nelišili od triploidů svou ekologií (Rydlo 2016). Ačkoliv diploidi druhu *Butomus umbellatus* tvoří veliké množství semen, rozmnožují se téměř výhradně vegetativně pomocí pacibulek, které se tvoří v paždí listů, a úlomky oddenků. Podobná je situace i u triploidů, kteří ale kvůli snížené fertilitě nejsou schopni samoopylení a tvoří jen minimální množství semen. Triploidi produkují oproti diploidům větší množství nadzemní i podzemní biomasy, jejich stvoly s květenstvími jsou vyšší než u diploidních rostlin a produkují více propagulí vegetativního množení, například i pacibulky

v květenstvích, které diploidi netvoří (Hroudová and Zákravský 1993a; Hroudová *et al.* 1996). Klíčivost semen a úspěšnost semenáčků je nízká u obou cytotypů, u diploidů je však kompenzována ohromnou produkcí semen, u triploidů vyšší investicí do vegetativního množení (Hroudová and Zákravský 1993b; a; Brown and Eckert 2005).

Doposud je k dispozici jen minimální množství studií, které by se věnovaly genetické variabilitě mezi jedinci (či populacemi) druhu *Butomus umbellatus* nebo dokonce genovému toku mezi jeho cytotypy. Kirschner *et al.* (2004) využili ke studiu genetické struktury populací diploidů a triploidů na území Česka a Slovenska isozymovou analýzu šesti polymorfních lokusů enzymatického aparátu. Genetická diverzita jedinců byla v některých populacích velmi nízká, což značí vysokou míru klonality, avšak vnitropopulační i mezipopulační heterozygotita u dalších populací nabývala poměrně vysokých hodnot pro diploidy i triploidy. Ve velmi ojedinělých případech (několik málo jedinců) bylo pomocí shlukové analýzy poukázáno i na možnost relativně nedávného vzniku triploidů z diploidů, případně genový tok mezi cytotypy. V další studii Eckert *et al.* (2003) byla ke zhodnocení genetické diverzity použita metoda RAPD (angl. Random amplified length polymorphism), avšak genetická variabilita byla extrémně nízká jak u převážně sterilních triploidů tak u fertálních diploidů, oba cytotypy měly pouze jeden široce rozšířený genotyp. Tato studie byla nicméně provedena na populacích šmelu okoličnatého v Severní Americe, kam byl tento druh přibližně před 150 lety zavlečen z Evropy. Je možné se domnívat, že omezená variabilita by mohla být způsobena i tím, že všechny populace vznikly z několika málo rostlin, které byly do Ameriky přivezeny (tj. efekt zakladatele; Flegr, 2009). Nelze ani vyloučit, že *Butomus umbellatus* obsazoval volnou ekologickou niku převážně prostřednictvím klonálního růstu, protože variabilita způsobená sexuálním rozmnožováním není potřeba, například kvůli nepřítomnosti přirozených patogenů či herbivorů.

Cílem navazující diplomové práce bude podrobnější analýza genetické diferenciaci cytotypů a reprodukčních interakcí mezi di- a triploidy ve smíšených populacích šmelu na území Východoslovenské nížiny. Před dvěma lety byly pro účely určování klonů a studia genetické variability vyvinuty pro *Butomus umbellatus* primery umožňující amplifikaci 14 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Rydlo 2016). Kromě molekulární genetické analýzy dospělých jedinců obou cytotypů plánuji také studium cytogenetické diverzity mezi semenáčky pocházejícími ze smíšených populací (kde očekáváme aneuploidy) pomocí průtokové cytometrie a klasické karyologie.

Hlavní otázky, které si budu klást ve své diplomové práci, jsou tyto:

1. Jaká je míra genetické diferenciaci mezi diploidy a triploidy ve smíšených populacích šmelu okoličnatého?
2. Bude genetická struktura triploidů v těchto populacích nasvědčovat jejich lokálnímu vzniku z diploidů nebo spíše jejich introdukci z jiných oblastí?

3. Je potomstvo vznikající v interploidních kříženích životaschopné? Jaké cytotypy můžeme mezi potomky očekávat? Podílí se hybridní potomstvo na zprostředkování genového toku mezi diploidy a triploidy?
4. Budeme schopni detekovat spontánní vznik triploidů z diploidů analýzou potomstva v uniformně diploidních populacích?
5. Proč ještě nebyl v přírodě zaznamenán tetraploidní cytotyp? Bude možné pomocí kolchicinu indukovat vznik životaschopných tetraploidů z diploidů?

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo představit proces polyploidizace jako jeden z neúčinnějších mechanismů sympatrické speciace u vyšších rostlin. Mezi polyploidy a jejich diploidními předky dochází k vytvoření téměř okamžité postzygotické reprodukční bariéry, což činí následnou hybridizaci mezi cytotypy poměrně obtížnou, ne však nemožnou. Mechanismy postzygotické reprodukční izolace mohou též v některých případech vyvolat efekt posílení, takzvaný reinforcement, při kterém dochází navíc k ustálení prezygotických reprodukčních bariér mezi různými cytotypy.

Jelikož většina studovaných cytotypově smíšených populací je složených z diploidů a tetraploidů, používá se pro reprodukční izolaci mezi nimi termín triploidní blok. Principy této reprodukční izolace však platí i pro systémy s vyšší ploidní úrovní. Mechanismy triploidního bloku jsme rozdělili na dvě kategorie, omezenou vitalitu a životaschopnost triploidních hybridů a snížení jejich fertility v dospělosti. Omezení životaschopnosti triploidních hybridů spočívá již v neschopnosti vytvořit křížením mezi diploidy a tetraploidy životaschopné semeno. Tento způsob reprodukční izolace mezi cytotypy nastává při tvorbě endospermu. Jeho tvorba je totiž narušena nerovnováhou v množství maternálních a paternálních genomů. Velmi často tak dochází k předčasné celularizaci nebo nadměrné proliferaci buněk endospermu, což způsobí, že se embryo nevyvine správně a semeno abortuje. Většina informací o kolapsu endospermu pochází z modelového druhu *Arabidopsis thaliana* a dalších druhů z čeledi Brassicaceae. I přesto, že jsou tyto druhy blízké příbuzné, molekulární mechanismy triploidního bloku se u nich alespoň částečně liší. Ještě více odlišností je možné najít u kukuřice (*Zea mays*) nebo u rodu *Solanum*. Molekulární mechanismy triploidního bloku tedy není možné generalizovat na všechny ostatní druhy krytosemenných rostlin a toto téma bude jistě předmětem dalšího studia. Rovněž bude předmětem dalšího studia druhý mechanismus triploidního bloku, omezená fertilita hybridů způsobená redukcí tvorby a životaschopnosti gamet, o níž je dostupných jen velmi málo materiálů, přestože se zdá být velmi běžným jevem.

Efektivita triploidního bloku se u různých druhů liší, ale u valné většiny z nich se při hybridizaci triploidní blok v menší či větší míře projeví. U některých druhů, jako je například chrastavec rolní (*Knautia arvensis*) byly doposud objeveny pouze tři nebo čtyři rostliny triploidního cytotypu. Je tedy možné soudit, že triploidní blok se u tohoto druhu realizuje téměř dokonale. Naproti

tomu u jestřábníku *Hieracium echiioides* jsou všechny cytotypy fertilní a velmi ochotně se mezi sebou kříží a dochází u nich k transferu genů mezi cytotypy. V přirozených kontaktních zónách cytotypů dochází běžně i ke genovému toku mezi ploidními úrovněmi a jeho intenzita se stejně jako efektivita triploidního bloku liší druh od druhu. Velmi často záleží i na tom, z jakého cytotypu probíhá přenos pylu (genů). Informace o genovém toku mezi cytotypy v sekundárních ale i primárních kontaktních zónách dozajista nejsou komplexní, a též si zaslouží vyšší pozornost vědců, která by vedla k odhalení mechanismů genového toku a všeobecných trendů.

Modelový druh pro navazující magisterskou práci, *Butomus umbellatus* L., se též vyskytuje v cytotypově smíšených populacích složených z diploidů a triploidů. Předešlé studie ukázaly, že mezi cytotypy může docházet k hybridizaci a tvorbě životaschopného potomstva, ale doposud nikdo nepodrobil analýze rostliny ze sympatricky se vyskytujících populací. Nedávno vyvinuté mikrosatelitové primery nám umožní náhled do genetické variability mezi dospělými jedinci a populacemi obou cytotypů. Pozornost si jistě zaslouží i cytologická a karyologická analýza semenáčků pocházejících především ze smíšených ale i vzácnějších diploidních populací, která by mohla odhalit vznik životaschopných aneuploidů, ale i detekovat spontánní či opakovaný vznik triploidů v těchto populacích.

7 Použitá literatura

- Barringer BC. 2007.** Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany* **94**: 1527–1533.
- Becraft PW, Gutierrez-Marcos J. 2012.** Endosperm development: dynamic processes and cellular innovations underlying sibling altruism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **1**: 579–593.
- Brannan CI, Bartolomei MS. 1999.** Mechanisms of genomic imprinting. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**: 164–170.
- Bretagnolle F. 2001.** Pollen production and spontaneous polyploidization in diploid populations of *Anthoxanthum alpinum*. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**: 241–247.
- Bretagnolle F, Thompson JD. 1995.** Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist* **129**: 1–22.
- Briggs D (David), Walters SM (Stuart M. 2001.** *Proměnlivost a evoluce rostlin*. Univerzita Palackého.
- Brown JS, Eckert CG. 2005.** Evolutionary increase in sexual and clonal reproductive capacity during biological invasion in an aquatic plant *Butomus umbellatus* (Butomaceae). *American Journal of Botany* **92**: 495–502.
- Brownfield L, Kohler C. 2011.** Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1659–1668.

- Burton TL, Husband BC. 2000.** Fitness differences among diploids, tetraploids, and their triploid progeny in *Chamerion angustifolium*: Mechanisms of inviability and implications for polyploid evolution. *Evolution* **54**: 1182–1191.
- Čertner M, Fenclová E, Kúr P, et al. 2017.** Evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations in an annual herb: dispersal, local persistence and recurrent origins of polyploids. *Annals of Botany* **120**: 303–315.
- Chapman MA, Abbott RJ. 2010.** Introgression of fitness genes across a ploidy barrier. *New Phytologist* **186**: 63–71.
- Coleman LC. 1950.** Nuclear conditions in normal stem tissue of *Vicia faba*. *Canadian Journal of Research* **28c**: 382–391.
- Comai L. 2005.** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**: 836–846.
- Costa LM, Gutiérrez-Marcos JF, Dickinson HG. 2004.** More than a yolk: the short life and complex times of the plant endosperm. *Trends in Plant Science* **9**: 507–514.
- van Dijk PJ, Bakx-Schotman JMT. 2004.** Formation of unreduced megaspores (diplospory) in apomictic dandelions (*Taraxacum officinale*, s.l.) is controlled by a sex-specific dominant locus. *Genetics* **166**: 483–92.
- Van Dijk P, Bakx-Schotman T. 1997.** Chloroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid *Plantago media*. *Molecular Ecology* **6**: 345–352.
- van Dijk PJ, Hartog M, Delden W Van. 1992.** Single cytotype areas in autopolyploid *Plantago media* L.*. *Biological Journal of the Linnean Society* **46**: 315–331.
- Duszynska D, McKeown PC, Juenger TE, Pietraszewska-Bogiel A, Geelen D, Spillane C. 2013.** Gamete fertility and ovule number variation in selfed reciprocal F1 hybrid triploid plants are heritable and display epigenetic parent-of-origin effects. *New Phytologist* **198**: 71–81.
- Eckert CG, Lui K, Bronson K, Corradini P, Bruneau A. 2003.** Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. *Molecular Ecology* **12**: 331–344.
- Fawcett JA, Maere S, Van de Peer Y. 2009.** Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 5737–42.
- Felber-Girard M, Felber F, Buttler A. 1996.** Habitat Differentiation in a Narrow Hybrid Zone between Diploid and Tetraploid *Anthoxanthum alpinum*. *The New Phytologist* **133**: 531–540.
- Flegr J. 2009.** *Evoluční biologie*. Praha: Academia.
- Florez-Rueda AM, Paris M, Schmidt A, Widmer A, Grossniklaus U, Städler T. 2016.** Genomic Imprinting in the Endosperm Is Systematically Perturbed in Abortive Hybrid Tomato Seeds. *Molecular biology and evolution* **33**: 2935–2946.

- Fowler NL, Levin DA. 1984.** Ecological Constraints on the Establishment of a Novel Polyploid in Competition with Its Diploid Progenitor. *The American Naturalist* **124**: 703–711.
- Gates RR. 1913.** I. A Contribution to a Knowledge of the Mutating *Oenotheras*. *Transactions of the Linnean Society of London. 2nd Series: Botany* **8**: 1–67.
- Gauthier P, Lumaret R, Bédécarrats A. 1998.** Genetic variation and gene flow in Alpine diploid and tetraploid populations of *Lotus* (*L. alpinus* (D.C.) Schleicher/*L. corniculatus* L.). I. Insights from morphological and allozyme markers. *Heredity* **80**: 683–693.
- Gehring M, Huh JH, Hsieh T-F, et al. 2006.** DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* **124**: 495–506.
- Haddadchi A, Gross CL, Fatemi M. 2013.** The expansion of sterile *Arundo donax* (Poaceae) in southeastern Australia is accompanied by genotypic variation. *Aquatic Botany* **104**: 153–161.
- Haig D, Westoby M. 1989.** Parent-Specific Gene Expression and the Triploid Endosperm. *The American Naturalist* **134**: 147–155.
- Haig D, Westoby M. 1991.** Genomic Imprinting in Endosperm: Its Effect on Seed Development in Crosses between Species, and between Different Ploidies of the Same Species, and Its Implications for the Evolution of Apomixis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **333**: 1–13.
- Hamamura Y, Nagahara S, Higashiyama T. 2012.** Double fertilization on the move. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 70–77.
- Han T-S, Wu Q, Hou X-H, et al. 2015.** Frequent Introgressions from Diploid Species Contribute to the Adaptation of the Tetraploid Shepherd's Purse (*Capsella bursa-pastoris*). *Molecular Plant* **8**: 427–438.
- Hanneman RE. 1994.** Assignment of Endosperm Balance Numbers to the tuber-bearing *Solanums* and their close non-tuber-bearing relatives. *Euphytica* **74**: 19–25.
- Hanzl M, Kola F, Novakova D, Suda J. 2014.** Nonadaptive processes governing early stages of polyploid evolution: Insights from a primary contact zone of relict serpentine *Knautia arvensis* (Caprifoliaceae). *American Journal of Botany* **101**: 935–945.
- Hardy OJ, Vanderhoeven S, De Loose M, Meerts P. 2000.** Ecological, morphological and allozymic differentiation between diploid and tetraploid knapweeds (*Centaurea jacea*) from a contact zone in the Belgian Ardennes. *New Phytologist* **146**: 281–290.
- Harlan JR, de Wet JMJ. 1975.** On Ö. Winge and a Prayer: The origins of polyploidy. *The Botanical Review* **41**: 361–390.
- Hedberg I. 1969.** Cytotaxonomic studies on *Anthoxanthum odoratum* L. s. lat. *Hereditas* **64**: 153–176.
- Henry IM, Dilkes BP, Young K, Watson B, Wu H, Comai L. 2005.** Aneuploidy and genetic variation in the Arabidopsis thaliana triploid response. *Genetics* **170**: 1979–88.

- Herben T, Suda J, Klimešová J. 2017.** Polyploid species rely on vegetative reproduction more than diploids: a re-examination of the old hypothesis. *Annals of botany* **120**: 341–349.
- Herben T, Trávníček P, Chrtek J. 2016.** Reduced and unreduced gametes combine almost freely in a multiploidy system. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **18**: 15–22.
- Hroudová Z, Krahulcová A, Zákravský P, Jarolímová V. 1996.** The biology of *Butomus umbellatus* in shallow waters with fluctuating water level In: *Management and Ecology of Freshwater Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, 27–30.
- Hroudová Z, Zákravský P. 1993a.** Ecology of Two Cytotypes of *Butomus umbellatus* III. Distribution and Habitat Differentiation in the Czech and Slovak Republics. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **28**: 425–435.
- Hroudová Z, Zákravský P. 1993b.** Ecology of Two Cytotypes of *Butomus umbellatus* II. Reproduction, Growth and Biomass Production. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **28**: 413–424.
- Hülber K, Sonnleitner M, Suda J, et al. 2015.** Ecological differentiation, lack of hybrids involving diploids, and asymmetric gene flow between polyploids in narrow contact zones of *Senecio carniolicus* (syn. *Jacobaea carniolica*, Asteraceae). *Ecology and Evolution* **5**: 1224–1234.
- Husband BC. 2004.** The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 537–546.
- Husband BC, Ozimec B, Martin SL, Pollock L. 2008.** Mating Consequences of Polyploid Evolution in Flowering Plants: Current Trends and Insights from Synthetic Polyploids. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 195–206.
- Husband BC, Sabara HA. 2003.** Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* **161**: 703–713.
- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, et al. 2011.** Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* **473**: 97–100.
- Johnston SA, den Nijs TPM, Peloquin SJ, Hanneman RE. 1980.** The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics* **57**: 5–9.
- Jones A. 1990.** *Unreduced Pollen in a Wild Tetraploid Relative of Sweetpotato*. [American Society for Horticultural Science].
- Jorgensen GA. 1928.** The experimental formation of heteroploid plants in the genus *Solanum*. *Journal of Genetics* **19**: 133–210.
- Jørgensen MH, Ehrich D, Schmickl R, Koch MA, Brysting AK. 2011.** Interspecific and interploidal gene flow in Central European *Arabidopsis* (Brassicaceae). *BMC Evolutionary Biology* **11**: 346.
- Jullien PE, Berger F. 2009.** Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 637–642.

- Jullien PE, Kinoshita T, Ohad N, Berger F. 2006.** Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *The Plant cell* **18**: 1360–72.
- Kao RH, Parker IM. 2010.** Coexisting Cytotypes of *Arnica cordifolia* : Morphological Differentiation and Local-Scale Distribution. *International Journal of Plant Sciences* **171**: 81–89.
- Kay QON. 1969.** The origin and distribution of diploid and tetraploid *Tripleurospermum inodorum* (L.) Schultz Bip. *Watsonia*.
- Kinoshita T. 2007.** Reproductive barrier and genomic imprinting in the endosperm of flowering plants. *Genes & Genetic Systems* **82**: 177–186.
- Kirschner J, Bartish I, Hroudová Z, Kirschnerová L, Zákavský P. 2004.** Contrasting patterns of spatial genetic structure of diploid and triploid populations of the clonal aquatic species, *Butomus umbellatus* (Butomaceae), in Central Europe. *Folia Geobotanica* **39**: 13–26.
- Köhler C, Hennig L, Spillane C, Pien S, Gruissem W, Grossniklaus U. 2003.** The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes & development* **17**: 1540–53.
- Köhler C, Makarevich G. 2006.** Epigenetic mechanisms governing seed development in plants. *EMBO reports* **7**: 1223–7.
- Köhler C, Mittelsten Scheid O, Erilova A. 2010.** The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends in Genetics* **26**: 142–148.
- Kolář F, Čertner M, Suda J, Schönswetter P, Husband BC. 2017.** Mixed-Ploidy Species: Progress and Opportunities in Polyploid Research. *Trends in plant science* **22**: 1041–1055.
- Kovalsky IE, Solís Neffa VG. 2012.** Evidence of 2n microspore production in a natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. *Journal of Plant Research* **125**: 725–734.
- Kradolfer D, Wolff P, Jiang H, Siretskiy A, Köhler C. 2013.** An Imprinted Gene Underlies Postzygotic Reproductive Isolation in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell* **26**: 525–535.
- Krahulcová A, Jarolímová V. 1993.** Ecology of Two Cytotypes of *Butomus umbellatus* I. Karyology and Breeding Behaviour. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **28**: 385–411.
- Kreiner JM, Kron P, Husband BC. 2017a.** Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytologist* **214**: 879–889.
- Kreiner JM, Kron P, Husband BC. 2017b.** Evolutionary Dynamics of Unreduced Gametes. *Trends in Genetics* **33**: 583–593.
- Lafon-Placette C, Köhler C. 2015.** Epigenetic mechanisms of postzygotic reproductive isolation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **23**: 39–44.
- Lafon-Placette C, Köhler C. 2016.** Endosperm-based postzygotic hybridization barriers: developmental mechanisms and evolutionary drivers. *Molecular Ecology* **25**: 2620–2629.
- Levin DA. 1971.** The Origin of Reproductive Isolating Mechanisms in Flowering Plants. *Taxon* **20**:

- Levin DA. 1975.** Minority Cytotype Exclusion in Local Plant Populations. *Taxon* **24**: 35.
- Levin DA. 1983.** Polyploidy and Novelty in Flowering Plants. *The American Naturalist* **122**: 1–25.
- Levin DA. 2002.** *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford University Press.
- Lewis WH. 1980.** Polyploidy in Species Populations In: *Polyploidy*. Boston, MA: Springer US, 103–144.
- Lin BY, Brink RA. 1984.** Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* **107**: 103–15.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH. 2008.** Review. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **363**: 3009–21.
- Lumaret R, Barrientos E. 1990.** Phylogenetic relationships and gene flow between sympatric diploid and tetraploid plants of *Dactylis glomerata* (Gramineae). *Plant Systematics and Evolution* **169**: 81–96.
- Lund G, Ciceri P, Viotti A. 1995.** Maternal-specific demethylation and expression of specific alleles of zein genes in the endosperm of *Zea mays* L. *The Plant Journal* **8**: 571–581.
- Lutz AM. 1907.** A preliminary note on the chromosomes of *Oenothera lamarckiana* and one of its mutants, *O. gigas*. *Science (New York, N.Y.)* **26**: 151–2.
- Mable BK. 2004a.** Polyploidy and self-compatibility: is there an association? *New Phytologist* **162**: 803–811.
- Mable BK. 2004b.** ‘Why polyploidy is rarer in animals than in plants’: myths and mechanisms. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 453–466.
- Maceira NO, Haan AA DE, Lumaret R, Billon M, Delay J. 1992.** Production of 2n Gametes in Diploid Subspecies of *Dactylis glomerata* L. 1. Occurrence and Frequency of 2n Pollen. *Annals of Botany* **69**: 335–343.
- Maceira NO, Jacquard P, Lumaret R. 1993.** Competition between diploid and derivative autotetraploid *Dactylis glomerata* L. from Galicia. Implications for the establishment of novel polyploid populations. *New Phytologist* **124**: 321–328.
- Mahé L, Le Pierrès D, Combes M-C, Lashermes P. 2007.** Introgressive hybridization between the allotetraploid *Coffea arabica* and one of its diploid ancestors, *Coffea canephora*, in an exceptional sympatric zone in New Caledonia (GJ Scoles, Ed.). *Genome* **50**: 316–324.
- Marks GE. 1966.** The Origin and Significance of Intraspecific Polyploidy: Experimental Evidence from *Solanum chacoense*. *Evolution* **20**: 552.
- Mason AS, Nelson MN, Yan G, Cowling WA. 2011.** Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *BMC Plant Biology* **11**: 103.
- Masterson J. 1994.** Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for Polyploidy in Majority of Angiosperms. *Science* **264**: 421–424.

- McKeown PC, Laouielle-Duprat S, Prins P, et al. 2011.** Identification of imprinted genes subject to parent-of-origin specific expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. *BMC Plant Biology* **11**: 113.
- Meirmans PG, VloT EC, Den Nijs JCM, Menken SBJ. 2003.** Spatial ecological and genetic structure of a mixed population of sexual diploid and apomictic triploid dandelions. *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 343–352.
- Menken SBJ, Smit E, Nijs HJCM Den. 1995.** Genetical population structure in plants: gene flow between diploid sexual and triploid asexual dandelions (*Taraxacum* section *ruderalia*). *Evolution* **49**: 1108–1118.
- Miller M, Zhang C, Chen ZJ. 2012.** Ploidy and Hybridity Effects on Growth Vigor and Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* Hybrids and Their Parents. *G3 (Bethesda, Md.)* **2**: 505–13.
- Mosquin T. 1967.** Evidence for autopolyploidy in *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Evolution* **21**: 713–719.
- Mozgova I, Köhler C, Hennig L. 2015.** Keeping the gate closed: functions of the polycomb repressive complex PRC2 in development. *The Plant Journal* **83**: 121–132.
- Müntzing A. 1936.** The Evolutionary Significance of Autopolyploidy. *Hereditas* **21**: 363–378.
- Nishiyama I, Inomata N. 1966.** Embryological studies on cross-incompatibility between 2x and 4x *Brassica*. *The Japanese journal of genetics* **41**: 27–42.
- Otto SP, Whitton J. 2000.** Polyploid Incidence and Evolution. *Annual Review of Genetics* **34**: 401–437.
- Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010.** Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* **186**: 5–17.
- Peckert T, Chrtek J. 2006.** Mating interactions between coexisting diploid, triploid and tetraploid cytotypes of *Hieracium Echioides* (Asteraceae). *Folia Geobotanica* **41**: 323–334.
- Petit C, Bretagnolle F, Felber F. 1999.** Evolutionary consequences of diploid–polyploid hybrid zones in wild species. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 306–311.
- Petit C, Lesbros P, Ge X, Thompson JD. 1997.** Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). *Heredity* **79**: 31–40.
- Ramsey J. 2007.** Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae). *Heredity* **98**: 143–150.
- Ramsey J, Ramsey TS. 2014.** Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **369**: 20130352.
- Ramsey J, Schemske DW. 1998.** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467–501.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002.** Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 589–639.

- Randolph LF. 1932.** Some Effects of High Temperature on Polyploidy and Other Variations in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **18**: 222–9.
- Rydlo J. 2016.** Ekologické důsledky polyploidizace u mokřadní rostliny šmelu okoličnatého (*Butomus umbellatus*).
- Sato T, Maceira N, Lumaret R, Jacquard P. 1993.** Flowering characteristics and fertility of interploidy progeny from normal and 2n gametes in *Dactylis glomerata* L. *New Phytologist* **124**: 309–319.
- Schatlowski N, Kohler C. 2012.** Tearing down barriers: understanding the molecular mechanisms of interploidy hybridizations. *Journal of Experimental Botany* **63**: 6059–6067.
- Scott RJ, Spielman M, Bailey J, Dickinson HG. 1998.** Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**.
- Segraves KA, Thompson JN. 1999.** Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera glossulariifolia*. *Evolution* **53**: 1114–1127.
- Slotte T, Huang H, Lascoux M, Ceplitis A. 2008.** Polyploid Speciation Did Not Confer Instant Reproductive Isolation in *Capsella* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1472–1481.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, et al. 2009.** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* **96**: 336–348.
- Soltis DE, Soltis PS. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in ecology & evolution* **14**: 348–352.
- Soltis DE, Soltis PS, Rieseberg LH. 1993.** Molecular Data and the Dynamic Nature of Polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**: 243–273.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2003.** Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* **161**: 173–191.
- Sonnleitner M, Hülber K, Flatscher R, et al. 2016.** Ecological differentiation of diploid and polyploid cytotypes of *Senecio carniolicus* sensu lato (Asteraceae) is stronger in areas of sympatry. *Annals of botany* **117**: 269–76.
- Stebbins GL. 1938.** Cytological characteristics associated with the different growth habits in the dicotyledons. *American Journal of Botany* **25**: 189–198.
- De Storme N, Geelen D. 2013.** Sexual polyploidization in plants: cytological mechanisms and molecular regulation. *The New phytologist* **198**: 670–84.
- Stoute AI, Varenko V, King GJ, Scott RJ, Kurup S. 2012.** Parental genome imbalance in *Brassica oleracea* causes asymmetric triploid block. *The Plant Journal* **71**: no-no.
- Thompson JD, Lumaret R. 1992.** The evolutionary dynamics of polyploid plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology & Evolution* **7**: 302–307.

- Trávníček P, Dočkalová Z, Rosenbaumová R, Kubátová B, Szeląg Z, Chrtek J. 2011.** Bridging global and microregional scales: ploidy distribution in *Pilosella echiioides* (Asteraceae) in central Europe. *Annals of Botany* **107**: 443–454.
- Tutin TG, Heywood VH, Webb DA, et al. 1980.** *Flora Europaea, Vol. 5: Alismataceae to Orchidaceae*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Wang X, Cheng Z-M, Zhi S, Xu F. 2016.** Breeding triploid plants: a review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **52**: 41–54.
- Waters AJ, Makarevitch I, Eichten SR, et al. 2011.** Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm. *The Plant cell* **23**: 4221–33.
- Weiss-Schneeweiss H, Emadzade K, Jang T-S, Schneeweiss GM. 2013.** Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenetic and genome research* **140**: 137–50.
- Wendel JF, Jackson SA, Meyers BC, Wing RA. 2016.** Evolution of plant genome architecture. *Genome Biology* **17**: 37.
- de Wet JMJ. 1971.** Polyploidy and Evolution in Plants. *Taxon* **20**: 29.
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH. 2009.** The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 13875–13879.
- Yamauchi A, Hosokawa A, Nagata H, Shimoda M. 2004.** Triploid bridge and role of parthenogenesis in the evolution of autopolyploidy. *The American naturalist* **164**: 101–12.
- Zohren J, Wang N, Kardailsky I, et al. 2016.** Unidirectional diploid-tetraploid introgression among British birch trees with shifting ranges shown by restriction site-associated markers. *Molecular ecology* **25**: 2413–26.